UNIVERSITÉ DE STRASBOURG — FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE SCOLAIRE 1963 - 1964 N° 832

Contribution à l'étude des propriétés lytiques du sérum sanguin humain vis-à-vis d'Eberthella typhosa

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 25 octobre 1963
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ (*Mention: Pharmacie*)

par

JEAN FEITZ

Pharmacien

Certifié de Chimie Biologique, de Physiologie Générale, de Sérologie et d'Hématologie

Examinateurs de la Thèse

MM. R. SARTORY, *Professeur, Président*

P. CORDIER, *Professeur*
J. MALGRAS, *Maître de Conférences* } *Juges*
L. COLOBERT, *Maître de Conférences*

IMPRIMERIE ALSATIA COLMAR
1963

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550001_0027

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG — FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE SCOLAIRE 1963 - 1964 N° 832

Contribution à l'étude des propriétés lytiques du sérum sanguin humain vis-à-vis d'Eberthella typhosa

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 25 octobre 1963
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg pour obtenir le titre de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ (*Mention: Pharmacie*)

par

JEAN FEITZ

Pharmacien

Certifié de Chimie Biologique, de Physiologie Générale, de Sérologie et d'Hématologie

Examinateurs de la Thèse

MM. R. SARTORY, *Professeur, Président*

P. CORDIER, *Professeur*
J. MALGRAS, *Maître de Conférences* } *Juges*
L. COLOBERT, *Maître de Conférences*

IMPRIMERIE ALSATIA COLMAR
1963

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

Administration :

MM. GAZET DU CHATELIER, Doyen
SCHREIBER, Assesseur
CLADY, Secrétaire

Professeurs :

MM.	SARTORY	Bactériologie
	CORDIER	Pharmacie chimique
	DUQUÉNOIS	Matière médicale
	JAEGER	Botanique
	GAZET DU CHATELIER	Pharmacie galénique
	HASSELMANN	Chimie analytique
	SCHREIBER	Chimie organique
	MÉTAIS	Chimie biologique
	LAUSTRIAT	Physique

Maîtres de Conférences :

MM.	LEDOUX	Sciences naturelles
	MALGRAS	Sciences naturelles
	LAPP (chargé des fonctions)	Sciences physico-chimiques
	DIRHEIMER (chargé d. fonct.)	Sciences appliquées

Cours Complémentaires :

MM.	SARTORY	Cryptogamie
	CORDIER	Eléments de Chimie organique
	DUQUÉNOIS	Hydrologie
	GAZET DU CHATELIER	Pharmacodynamie
	HASSELMANN	Bromatologie
	SCHREIBER	Chimie générale
	LAVIGNE	Législation et Déontologie
	MÉTAIS	Bioch. anal. et séméiologique
	LAUSTRIAT	Eléments de Mathématiques
	LEDOUX	Technique bactériologique
	MALGRAS	Sérologie et bactériologie
	LAPP	Chimie minérale
	MEYER	Comptabilité et Fiscalité

Chefs de Travaux Pratiques:

Mme	Kristensen	Chimie pharmaceutique
Mme	Ourisson	Histoire naturelle
MM.	Mathis	Chimie
	Stahl	Bactériologie et Parasitologie
	Romond	Bactériologie
	Wermuth	Chimie
	Jung	Physique

Au Président du Jury de ma Thèse,

Monsieur René SARTORY

Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.

À mes Juges,

Monsieur Paul CORDIER

Professeur de Pharmacie chimique
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.

Monsieur Jacques MALGRAS

Maître de Conférence de Sciences Naturelles
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.

Monsieur Louis COLOBERT

Médecin Lieutenant-Colonel, Maître de Recherches du Service de Santé des Armées, Chef de la Division de Microbiologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées. Maître de conférences à la Faculté des Sciences de Grenoble.

Hommage de sincère reconnaissance.

A ma femme et à ma fille,

À mes parents,

en témoignage de ma reconnaissance et de mon affection,

À tous les miens,

À tous mes amis.

INTRODUCTION

A la suite de la découverte mémorable de la phagocytose par Metchnikoff en 1883, l'immunité fut tout d'abord considérée comme un phénomène exclusivement cellulaire. Mais on s'est bien vite rendu compte que le sérum sanguin, exempt de cellules, présentait un pouvoir bactéricide et bactériolytique. Depuis, de nombreux travaux ont montré l'existence de substances antimicrobiennes dans le sang, les leucocytes et les tissus lymphatiques, bien que le mécanisme d'action de la plupart d'entre elles ne soit pas élucidé. On a tenté par la suite de classifier ces agents antimicrobiens suivant leur origine tissulaire ou humorale et suivant leur sélectivité vis-à-vis des bactéries à Gram positif ou négatif. Certains facteurs montrent une prédilection vis-à-vis d'un groupe de bactéries, alors que d'autres sont actifs contre des représentants des deux groupes ou ne présentent pas de différence sélective. En dépit de ces restrictions, l'aptitude de ces agents vis-à-vis des formes à Gram positif ou négatif est évidente et permet une division commode.

Notre travail porte sur l'étude d'un système lytique humoral, actif contre les bactéries à Gram négatif. Il existe certainement dans le sang plusieurs systèmes lytiques différents, actifs sur les bactéries à Gram négatif. Ceux de la bactériolyse spécifique font entrer en jeu à la fois les anticorps et le complément, d'autres paraissent dénués de spécificité immunologique et semblent faire entrer en jeu soit le système du complément et de l'« anticorps normal », soit la properdine ou le lysozyme. Un facteur lytique de découverte récente, l'obsistine, est venu compléter ces divers systèmes.

Dans la première partie de notre travail, nous exposerons l'historique et l'état actuel de nos connaissances sur divers mécanismes de l'immunité humorale bactériolytique vis-à-vis des formes à Gram négatif. Le chapitre I[er] est consacré au système anticorps-complément. Après les travaux de Bordet, on admit longtemps que toute réaction de défense de l'organisme se traduisant par une lyse cellulaire, était due à deux facteurs, le complément et l'anticorps. La découverte et les propriétés de la properdine et du lysozyme, qui feront l'objet des chapitres II et III, ont amené la révision de cette conception par trop uniciste. L'étude de l'action du

lysozyme sur les bactéries à Gram négatif entreprise par de nombreux auteurs, nous a conduit à soulever une hypothèse de travail sur le rôle éventuel de la lipoprotéine-lipase du sérum dans la bactériolyse non spécifique. C'est pourquoi nous avons consacré le chapitre IV à l'exposé des connaissances actuelles sur cet enzyme, bien que celui-ci n'entre pas classiquement dans le cadre des facteurs antimicrobiens. Les données récentes sur un facteur lytique apparemment nouveau, l'obsistine, présent dans les sérums normaux et actif vis-à-vis des bactéries à Gram négatif, seront exposées dans le chapitre V.

La seconde partie de notre travail est consacrée à l'exposé des résultats de nos recherches expérimentales. Après avoir présenté dans le chapitre VI les conditions et la technique de la mesure de l'activité lytique du sérum normal, nous montrerons dans le chapitre VII que l'obsistine, que l'on savait déjà différente du lysozyme, de la properdine et du système immunitaire du complément, ne peut pas s'identifier à la lipoprotéine-lipase du sérum. L'obsistine ne pouvant être identifiée à aucun des facteurs bactériolytiques décrits jusqu'à ce jour, nous avons entrepris de fractionner le principe actif des sérums. Le chapitre VIII sera consacré au fractionnement du sérum en deux fractions inactives, mais dont la réunion restaure l'activité lytique initiale. Diverses propriétés de ces deux fractions et certaines conditions de l'activité lytique de leur mélange seront précisées. Des tentatives de fractionnement plus poussé de ces deux fractions par relargage par les sels ou chromatographie seront rapportées aux chapitres IX et X. Ceci nous a conduit à montrer que nous sommes en présence d'un système biologique complexe et fragile, formé par la réunion d'au moins quatre facteurs.

Ce travail s'insère dans une série de travaux sur les mécanismes de la défense non spécifique de l'organisme contre l'infection, entrepris à la Division de Microbiologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées à Lyon. Le Médecin Lieutenant-Colonel L. Colobert, Maître de Recherches du Service de Santé des Armées, Chef de la Division de Microbiologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, a été l'instigateur de ce travail dont il a suivi et guidé pas à pas la progression et la réalisation. Nous tenons à lui exprimer notre profonde reconnaissance et notre sincère attachement.

Nos remerciements respectueux vont à notre Maître, Monsieur R. Sartory, Professeur de Bactériologie et de Cryptogamie à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, qui a bien voulu s'intéresser à ce travail tout au long de son élaboration et qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

Nous tenons également à exprimer notre gratitude à Monsieur P. Cordier, Professeur de Pharmacie chimique à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg, qui a bien voulu faire partie de notre jury de thèse.

Notre reconnaissance va également à Monsieur J. Malgras, Maître de Conférence de Sciences Naturelles à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg. Nous avons été très sensible aux marques de sympathie qu'il nous a toujours témoignées et nous sommes très heureux qu'il ait bien voulu accepter de juger ce travail.

Nous ne manquerons pas de remercier aussi tous nos amis de la Division de Microbiologie du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, en particulier le Docteur A. Kirn et Monsieur G. Dirheimer, qui tous, dans une atmosphère agréable, ont contribué à l'élaboration de cette thèse.

Première Partie

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Activité antibactérienne du sérum

Chapitre Premier

LE SYSTÈME ANTICORPS-COMPLÉMENT

Alexine et complément

Dès 1888 Nuttal (80) observa que le sang défibriné de chien ou de lapin possédait des propriétés bactéricides pour diverses bactéries à Gram négatif. L'année suivante, Buchner confirma ces observations sur du sérum normal dépouillé de cellules libres (15). Il montre que le sang complet congelé et décongelé, perd ses propriétés antibactériennes vis-à-vis d'*Eberthella typhosa*, alors que le sérum normal, sans éléments cellulaires, traité dans les mêmes conditions, garde toute son activité. Il note que cette activité bactéricide du sérum de chien et de lapin peut être considérée comme constante, si l'on prend la précaution de ne pas défibriner le sang mais de prélever simplement le sérum qui exsude du caillot. Ses travaux l'amenèrent à constater que cette propriété disparaissait par chauffage de 30 minutes à 56° C ou de 6 heures à 52° C, et que le sérum était tout à fait inactivé par simple dialyse contre de l'eau distillée (15). Buchner chercha à voir si les bactéries étaient bien tuées après contact avec le sérum et il indique que les germes ainsi traités ne redonnent aucune culture par ensemencement sur un milieu nutritif riche. Le microscope montre que la forme des bactéries est modifiée: les bâtonnets deviennent irréguliers et leur contenu se granule. La substance thermolabile responsable de l'activité antimicrobienne des sérums normaux fut appelée alexine par Buchner (du grec: parer, éviter, défendre contre) (16).

Ces premières observations furent suivies en 1891 des travaux de Behring et Nissen qui mirent en évidence le pouvoir bactéricide du sang chez les animaux vaccinés (6). Ils effectuèrent leurs expériences à l'aide du vibrion avicide ou *Vibrio metchnikovi*, qui détermine chez les pigeons et les cobayes une septicémie rapidement mortelle. Or, en vaccinant des animaux avec des cultures tuées de *Vibrio metchnikovi*, Behring et Nissen constatèrent que les sérums prélevés sur des animaux ainsi traités étaient capables de protéger les animaux neufs de l'infec-

tion. De plus en ensemençant le vibrion dans le sérum d'un cobaye immunisé, ils purent voir que le vibrion ne s'y développait pas et qu'il était tué, alors qu'il se multipliait très bien dans le sérum d'un animal non vacciné. Cette action bactéricide s'exerce donc aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, et pour ces auteurs elle conditionne l'immunité de l'animal. On verra que dès lors va s'établir une confusion entre le pouvoir bactéricide des sérums normaux observé par Nuttal et Buchner et le pouvoir bactéricide des sérums d'animaux vaccinés.

Pfeiffer et Isaeff reprenant ces observations, effectuèrent l'expérience demeurée célèbre et habituellement décrite sous le nom de « phénomène de Pfeiffer » (84). Ils utilisèrent cette fois du vibrion cholérique. Chez le cobaye, le vibrion cholérique est assez bien toléré lorsqu'il est injecté sous la peau, mais inoculé dans la cavité péritonéale, il détermine rapidement une septicémie mortelle. Bordet, dans son Traité de l'immunité, rapporte l'expérience en ces termes: « Il est très facile de protéger les cobayes contre cette péritonite cholérique. Il suffit de leur injecter au préalable le vibrion sous la peau, de préférence à deux ou trois reprises. Les animaux vaccinés de la sorte fournissent un sérum préventif capable de mettre les animaux neufs à l'abri des redoutables conséquences de l'inoculation intrapéritonéale. Bien que le *Vibrio metchnikovi* et le vibrion cholérique appartiennent tous deux à des espèces voisines, le sérum d'animaux vaccinés contre l'un de ces germes ne protège pas contre l'autre, le pouvoir préventif est strictement spécifique. Le pouvoir stérilisateur constatable *in vitro* offre le même caractère: ensemencé dans le choléra-sérum, le vibrion metchnikovi pousse aisément, tandis que le vibrion cholérique est tué; d'autre part celui-ci reste indemne quand on l'introduit dans le sérum actif vis-à-vis du vibrion metchnikovi » (11).

En poursuivant l'analyse du processus défensif, Pfeiffer et Isaeff recherchèrent ce qu'il advenait des vibrions inoculés dans le péritoine des cobayes vaccinés au préalable. Ils constatèrent un fait des plus intéressants: « Injecté en dose suffisante dans le péritoine d'un cobaye neuf, le microbe garde sa mobilité, sa forme normale, se multiplie et détermine bientôt la mort. Il en va tout autrement chez le cobaye immunisé: si quelques minutes après l'injection on retire par ponction (en enfonçant à travers la paroi abdominale l'effilure d'un tube de verre) une trace d'exsudat péritonéal, on constate que les microbes se sont complètement transformés. Au lieu de bâtonnets incurvés mobiles que l'on avait introduits, on ne retrouve plus désormais que des éléments immobiles, sphériques, ayant par conséquent l'aspect de microcoques, peu réfringents et assez ternes, n'ayant plus pour les colorants qu'une affinité médiocre. Parfois un vibrion ne fournit en s'arrondissant qu'un seul granule, parfois il se découpe et en donne deux ou trois. Cette trans-

formation en granules arrondis est aussi rapide que généralisée, elle est l'indice évident d'une influence bactéricide très énergique » (11). Pfeiffer, ne pouvant reproduire son phénomène *in vitro*, interpréta ces faits comme étant dus à une réaction locale péritonéale. Il pensa que ce phénomène exigeait l'intervention d'une activité vitale et réclamait le concours d'une substance bactéricide élaborée par l'endothélium péritonéal.

C'est à Bordet en 1895 que revint le mérite de faire entrer le phénomène de la bactériolyse immunitaire dans le cadre de l'immunité humorale. Reprenant les expériences de Pfeiffer, il réussit à reproduire le phénomène *in vitro* en se servant d'un sérum frais et montra que ce phénomène peut se manifester dans des liquides entièrement exempts d'éléments cellulaires. Il détermina que l'immunsérum chauffé à 55° C pendant vingt minutes conservait ses propriétés agglutinantes mais perdait ses propriétés lytiques et que celles-ci étaient restaurées par addition d'une petite quantité de sérum frais d'un animal non vacciné. Bordet édifia alors sa théorie des « deux substances » et formula que la bactériolyse résulte de la coopération de deux facteurs distincts et indépendants; l'un de ces facteurs est spécifique, thermostable et représente l'apanage exclusif de l'animal vacciné, c'est l'anticorps; l'autre, thermolabile, non spécifique, existe chez tous les animaux qu'ils soient vaccinés ou neufs. Et dès ce moment, Bordet crut pouvoir identifier le principe non spécifique thermolabile à l'alexine de Buchner, dont il possède apparemment les caractères. Il déclare dans son Traité de l'immunité: « Non bactéricide par lui-même, l'anticorps assure l'effet antiseptique grâce au concours de la matière globulicide ou microbicide proprement dite et qui est l'alexine. Comme nous allons le voir, il confère à l'élément qu'il atteint spécifiquement l'aptitude à absorber l'alexine et par conséquent à en ressentir la néfaste influence » (11).

En 1898, Bordet immunisa des animaux avec du sang provenant d'espèces différentes et produisit un antisérum qui lyse les globules rouges (10). Il montra que, comme dans la bactériolyse, l'hémolyse dépendait de l'interaction de deux substances distinctes: un facteur thermolabile présent dans le sérum normal, capable d'induire la lyse lorsque les globules sont combinés avec un deuxième facteur, spécifique et thermostable, développé chez l'animal en résultat de l'immunisation. Ehrlich et Morgenroth reprirent ces travaux et s'attachèrent principalement à l'étude des hémolysines naturelles. Ils observèrent que lorsqu'un sérum normal capable d'hémolyser des érythrocytes étrangers à 37° C, était mélangé à ces mêmes cellules à 0° C et que l'on effectuait une centrifugation ensuite, le surnageant n'avait plus la propriété de lyser les globules rouges à 37° C. Mais cette propriété réapparaît si on ajoute au sérum centrifugé du sérum normal chauffé à 55° C pendant trente

minutes et incapable à lui seul de lyser les hématies. Ehrlich admet que la substance absorbée à 0° C est un anticorps et appelle la substance labile du sérum, le complément (34). Il s'acharna à démontrer que cette substance thermolabile intervenant dans les systèmes hémolytiques n'était en fait rien d'autre que l'alexine de Buchner, active elle, sur les bactéries. La question se posait de savoir dès lors, si la bactériolyse ou l'hémolyse comporte la participation de compléments ou alexines différentes selon que l'on opère sur telle espèce microbienne ou sur des globules de telle provenance. La théorie de l'unicité du complément formulée par Bordet finit par prévaloir sur l'opinion d'Ehrlich qui admettait qu'il existait dans chaque sérum une série de compléments divers, aptes chacun à altérer de préférence tel antigène déterminé et à s'accorder avec telle sensibilisatrice, à l'exclusion des autres.

Ainsi dès le début du siècle, sous l'influence de Bordet, se trouve affirmée sans preuves expérimentales véritablement indiscutables, l'identité de l'alexine de Buchner, principe bactéricide et bactériolytique des sérums normaux, avec l'élément thermolabile bactériolytique et peu bactéricide entrant en jeu dans le phénomène de Pfeiffer, dans les immunsérums d'animaux vaccinés. On admit dès lors que toute réaction de défense se traduisant par une lyse cellulaire était due à deux facteurs, l'un le complément, thermolabile, non spécifique, possédant l'activité lytique sur les cellules sensibilisées; l'autre, l'anticorps, thermostable, spécifique vis-à-vis de la cellule à lyser mais sans activité lytique propre.

Le complément

Le nom de complément qu'Ehrlich avait donné à la fraction thermolabile du sérum fit rapidement fortune. En 1909, Muir (77) définit le complément comme étant « la substance labile du sérum normal qui est captée par la combinaison de l'antigène et de son anticorps correspondant ». La vibriolyse de Pfeiffer fut expliquée par la fixation de l'anticorps spécifique produit par la vaccination sur le vibrion, suivie de l'intervention du complément pour provoquer la lyse. De même, les hématies de mouton mises au contact de sérum de lapin préparé par injection de globules rouges de mouton, fixent l'hémolysine produite et sont ensuite lysées sous l'influence du complément. Cette définition n'est cependant pas tout à fait exacte car l'on sait aujourd'hui que le complément ne se fixe pas sur tous les systèmes antigène-anticorps. La définition de Muir a d'autre part le défaut d'impliquer ce qui au fond n'est qu'une hypothèse, celle de l'unicité des mécanismes de bactériolyse et d'hémolyse. La définition que Bordet donne du complément ou alexine a, elle, le mérite d'être strictement expérimentale. Ce dernier l'a défini par trois propriétés nécessaires: la capacité d'exalter l'hémolyse ou la bactériolyse en présence de l'immunsérum spécifique, la thermolabilité, et

l'inactivation par addition d'un complexe antigène-anticorps. Bordet s'exprime en ces termes: « Lorsque l'on observe que le pouvoir hémolytique ou bactériolytique d'une humeur s'exalte en présence de l'immunsérum (chauffé à 55° C) spécifiquement approprié à l'élément en jeu et que d'autre part le liquide devient inactif par chauffage à 55° C et aussi par contact avec une quantité suffisante d'un antigène dûment sensibilisé, on est autorisé à dire que le principe considéré est vraiment de caractère alexique car il possède la série des caractères requis » (11).

Mais après les observations de Bordet et les nombreuses études et investigations d'Ehrlich et de son école sur l'interaction entre globules rouges et antisérums correspondants, les chercheurs détournèrent leur attention de la bactériolyse vers l'hémolyse. Les systèmes hémolytiques ont ainsi été très étudiés, surtout en raison de la facilité relative avec laquelle on peut apprécier une hémolyse. De nombreux auteurs ont accepté l'hypothèse de l'unicité des mécanismes immunitaires et ont admis tacitement que les résultats obtenus dans l'étude des systèmes hémolytiques pouvaient être transférés par analogie à l'interaction du sérum avec les bactéries.

De par son rôle dans les réactions immunitaires, le complément avait acquis une importance théorique très grande. Dans les années suivantes vint s'ajouter une importance pratique considérable, avec l'apparition des nombreuses réactions de diagnostic utilisant la déviation du complément. Un grand nombre de travaux ont vu le jour dans le but d'identifier chimiquement et d'établir la nature du complément. Nous savons aujourd'hui que le complément n'est pas une substance unique, mais qu'il s'agit d'un ensemble de plusieurs fractions. Le complément global est désigné par le symbole C' et les divers composants par les symboles C'1, C'2, C'3, C'4 (52).

Ferrata (37), dès 1907, par dialyse contre de l'eau distillée, a séparé deux fractions isolément inactives. L'une de ces fractions est insoluble dans l'eau distillée et est de nature euglobulinique. La seconde est soluble dans l'eau distillée et s'identifie au groupe des pseudo-globulines. Brand montre que ces deux constituants se fixent selon un certain ordre sur des globules sensibilisés (12). Ces derniers ne sont lysés que si l'on fait agir le composant euglobulinique en premier lieu, d'où le nom de chaînon central C'1 donné à ce constituant, par opposition au composant pseudoglobulinique appelé chaînon terminal ou C'2. L'existence d'une troisième fraction fut découverte par action du venin de Cobra sur le sérum frais. Ritz, en 1912, montre que le pouvoir alexique du sérum frais, supprimé par addition de venin de Cobra, pouvait être restitué en ajoutant à ce sérum, un sérum inactivé par chauffage à 56° C (92). Il arriva ainsi à la conclusion que la fraction détruite par le venin n'était ni le chaînon central C'1, ni le chaînon terminal C'2, tous deux thermo-

labiles, mais un troisième constituant, thermostable, et qui fut appelé C'3. En traitant du sérum frais avec de l'ammoniaque, Gordon, Whitehead et Wormall constatèrent que le sérum perdait son pouvoir complémentaire, mais que cette activité était restaurée par addition d'un sérum chauffé à 56° C et traité par le venin de cobra (43). On individualisa ainsi une quatrième fraction, C'4, ammoniolabile et thermostable.

De nombreux travaux ont eu pour but d'isoler et de préciser la nature et les propriétés physico-chimiques de ces divers composants du complément. Ainsi C'1 a été isolé du sérum de cobaye par fractionnement des euglobulines à l'aide de sulfate d'ammonium, sous forme d'une protéine homogène à l'électrophorèse et à l'ultracentrifugation (86). D'après Pillemer et Collaborateurs (87) il s'agit d'une euglobuline dont la constante de sédimentation est de 6,9 S, de mobilité électrophorétique $2{,}9.10^{-5}$ en tampon véronal pH 7,8, force ionique 0,1. Son point isoélectrique apparent serait de 5,2 à 5,4. C'1 représente 0,7 à 0,8% des protéines totales du sérum et se retrouve dans la fraction III-2 de Cohn. Ecker considère cette fraction comme une glucoprotéine contenant 4,26% de polysaccharides et 23,4% d'hydroxyaminoacides. Elle est thermolabile et perd toutes ses propriétés par chauffage à 55° C pendant 15 minutes.

C'2 a été obtenu à l'état purifié par Seifter, Dozois et Ecker en précipitant le sérum humain à pH 6,8 à l'aide de sulfate d'ammonium (104). C'est une globuline de mobilité électrophorétique $2{,}6.10^{-5}$ (à pH 7,8, force ionique 0,1), contenant 2% de glucides, et qui se retrouve dans la fraction IV de Cohn.

Le composant C'3 est de composition chimique encore mal définie et on n'a pas réussi à l'isoler sous une forme purifiée. Il est soluble dans le sulfate d'ammonium 1,39 M mais insoluble dans le sulfate d'ammonium 2 M. A partir du sérum humain, il précipite en même temps que C'1 et après remise en solution de ce précipité et traitement par l'alcool éthylique, on peut obtenir un nouveau précipité contenant 70% de C'3. Cette fraction possède également la propriété d'être adsorbée par le zymosan et ne peut en être éluée.

La fraction C'4 est de nature mucoprotéique et on pense qu'elle contiendrait un groupement actif carbonyl. Elle est sensible aux amines primaires et aux sels d'ammonium de pH 8 à 10. Elle est soluble avec C'2 dans le sulfate d'ammonium 2 M mais insoluble dans le même sel à la concentration 2,5 M. Au cours des réactions de précipitation, ce composant est associé de façon stable chez le cobaye, à la fraction C'2, alors que dans le sérum humain, on retrouve C'4 dans le même précipité que C'1 et sous une forme très labile.

Comme autres propriétés physicochimiques des divers composants du complément, indiquons que la dialyse du sérum contre un tampon phosphaté de pH 5,5 et de force ionique 0,02, forme un précipité contenant

C'1 et C'3 et un surnageant renfermant C'2 et C'4. Par chauffage à 55° C pendant 20 minutes, les composants C'1 et C'2 sont détruits mais ni C'3 ni C'4. Pour que le complément manifeste une action, il faut la présence dans le milieu réactionnel d'ions Ca^{++} et Mg^{++}.

Les différentes phases du processus qui aboutit à la lyse d'hématies sensibilisées par l'action du complément a fait l'objet de nombreux travaux. Brand constata le premier lors du fractionnement du sérum par dialyse contre de l'eau distillée, que les deux composants isolés intervenaient dans un ordre bien déterminé sur les hématies (12). Le chaînon moyen doit nécessairement agir en premier, puis le chaînon terminal, car sinon la lyse n'a pas lieu. A la suite des travaux qui aboutirent à l'isolement des quatre fractions C'1, C'2, C'3 et C'4, on se rendit rapidement compte que l'intervention de ces divers composants n'est pas simultanée mais que leur ordre d'action sur les globules rouges sensibilisés était C'1, C'4, C'2 puis C'3 qui déclenche brusquement la lyse. De plus la présence d'ions calcium et magnésium est nécessaire dans le milieu. Mayer et Levine (72) montrèrent que les hématies sensibilisées fixent en premier lieu C'1 et C'4 en présence de Ca^{++}. Dans un second temps, la fraction C'2 se fixera avec intervention des ions Mg^{++}. Lorsque ce complexe est formé, la présence de C'3 provoque instantanément la lyse des hématies. On peut résumer l'ensemble de ce processus de fixation des diverses fractions du complément par le schéma de Levine, Mayer et Coll. (67 - 73):

E (erythrocyte) + A (anticorps) ⟶ EA

EA + C'1 + C'4 $\xrightarrow{Ca^{++}}$ EA-C' (1 + 4)

EA-C' (1 + 4) + C'2 $\xrightarrow{Mg^{++}}$ EA-C' (1 + 4 + 2)

EA-C' (1 + 4 + 2) + C'3 ⟶ stroma + hémoglobine

Laporte (64 - 65) étudiant le rôle du premier composant dans la cinétique de la fixation du complément, montre que C'1 peut être fixé indépendamment de C'4 et que l'agent de liaison entre C'1 et le complexe antigène-anticorps est le calcium. Il a établi ce fait en utilisant de l'EDTA qui forme un chélate avec le calcium et qui libère C'1 à partir des complexes EA-C'1. Mais si la fixation de C'1 peut être séparée de celle de C'4, la présence de C'1 est nécessaire pour la fixation de C'4 puis de C'2. Une fois formé le complexe EA-C' (1 + 4 + 2), on peut éluer C'1, le complexe EA-C' (4 + 2) restant sensible à C'3.

Ce mécanisme de fixation est valable pour le complément de cobaye ou humain. Bier et coll. ont montré que les sérums des différentes espèces ne pouvaient pas être utilisés indifféremment et de façon interchangeable (7), et Scaffidi, Cerbone et Petrelli (101) ont démontré expérimentalement que les compléments des diverses espèces animales n'avaient pas la même aptitude à révéler un système hémolytique.

Anticorps Normal

De la confusion faite au début du siècle entre l'immunité humorale naturelle et l'immunité humorale acquise après vaccination, de l'identification des mécanismes de l'hémolyse et de la bactériolyse, devait tout naturellement découler la notion d'« anticorps normal ». Nuttal, puis Buchner, ayant établi qu'il existait une activité bactéricide et bactériolytique dans les sérums normaux, on chercha à expliquer cette propriété par l'action du complément et d'un autre facteur qu'on dénomma « anticorps normal ou naturel ».

De nombreux travaux ont eu pour objet la mise en évidence d'« anticorps normaux » dans le sérum. Dès 1928, Dunlop (33) montra que les sérums d'individus non vaccinés et n'ayant pas de salmonelloses dans leurs antécédents, fixent le complément en présence d'*Eberthella typhosa* pris comme antigène, comme on peut le mettre en évidence par l'emploi d'un système hémolytique associé. Gordon et Wormall (44) ont montré que les bacilles dysentériques tués par la chaleur enlèvent le pouvoir bactéricide du sérum normal après incubation d'une heure à 0° C, quoique la propriété hémolytique vis-à-vis des globules rouges sensibilisés n'ait que légèrement diminué. Le pouvoir bactéricide réapparaît par addition de sérum normal chauffé à 56° C pendant trente minutes. Les auteurs considèrent que le facteur enlevé à 0° C est un anticorps « normal ».

Cependant ces « anticorps normaux » se différencient nettement des anticorps d'immunité acquise, qui sont des gamma-globulines thermostables. Beaucoup d'expérimentateurs ont montré que l'« anticorps normal » est inactivé après trente minutes de chauffage entre 55° C et 60° C (70 - 71), alors que les anticorps ordinaires nécessitent des températures de 70° C et même parfois plus élevées pour se trouver inactivés. En plus de leur caractère de thermolabilité, la spécificité des « anticorps normaux » est très discutable. Pour beaucoup d'investigateurs ils ne sont pas ou sont peu spécifiques. Dunlop (33) a ainsi pu enlever l'activité bactéricide du sérum vis-à-vis de plusieurs souches bactériennes avec du charbon ou de la poudre de verre utilisée à basse température. Gordon et Carter (42) ont pu supprimer dans le sérum l'effet bactéricide pour différentes bactéries, à l'aide d'un procédé ne faisant pas appel à la spécificité immunologique, par absorption à froid avec une suspension quelconque de bactéries tuées. Maaløe en 1946 (69) a conclu que le sérum ne contenait probablement qu'un ou un petit nombre d'« anticorps normaux », franchement non spécifiques. Malgré ces difficultés, l'identité de ces deux groupes de substances a été maintenue, grâce aux multiples efforts faits pour assurer l'unité des « anticorps normaux » et des anticorps d'immunité acquise.

On a tenté d'expliquer la confusion qui règne au sujet de la non

spécificité des « anticorps naturels » par la présence dans les sérums apparemment normaux, d'anticorps spécifiques à des taux habituellement non titrables (39). Mais il est difficile d'imaginer que le sérum contienne une multitude d'anticorps, nécessaires pour sensibiliser un grand nombre de bactéries sensibles et spécifiques chacune pour son propre compte. De nombreux auteurs ont admis l'hypothèse de Landsteiner selon laquelle une grande variété de molécules de globulines du sérum joueraient le rôle d'anticorps spécifique en vertu d'une affinité accidentelle envers certains substrats (61).

On continua cependant à admettre que dans les expériences où l'hémolyse d'hématies non sensibilisées et l'action bactériolytique se produisent en l'absence d'anticorps spécifiques, l'« anticorps normal » du sérum représenterait le second composant nécessaire à la réaction. Petterson en 1936 (83) a introduit le terme d'alpha-lysine pour décrire le système bactéricide et bactériolytique des sérums normaux, actif sur les bactéries à Gram négatif. Ce système serait constitué de deux facteurs thermolabiles, l'alexine de Buchner et l'« anticorps naturel ».

Le mécanisme de l'immunité humorale naturelle et celui de l'immunité humorale acquise continuèrent ainsi à répondre à la théorie uniciste de Bordet, où complément et anticorps sont seuls à jouer un rôle.

Chapitre II

LA PROPERDINE

Si la théorie du « système anticorps-complément » ne peut être contestée dans le cadre de l'immunité humorale spécifique acquise, elle n'explique cependant pas tous les faits observés par de nombreux investigateurs. La découverte de la properdine en 1954 par Pillemer et coll. apporta un nouvel élément au complexe de l'immunité humorale. Ce nouveau facteur sembla jouer un rôle primordial dans l'immunité naturelle aux infections. On pensa que son abondance variable d'une espèce animale à l'autre, ou d'un sérum à l'autre dans la même espèce, pourrait expliquer les divers degrés de résistance qu'offrent les individus ou les espèces animales à une infection donnée et ceci indépendamment de toute immunisation antérieure.

C'est au cours de leurs travaux sur la purification de la fraction C'3 du complément que Pillemer et ses collaborateurs ont mis en évidence en 1954 une nouvelle substance protéique présente dans le sérum normal (85). On savait depuis longtemps que la levure de bière était capable d'inactiver le complément. Pour étudier ce phénomène, Pillemer prépara le zymosan, polysaccharide complexe des parois purifiées de levures. Il montra que le zymosan, mis en contact avec du sérum frais normal pendant une heure à 37° C, fixe la fraction C'3 du complément et fait perdre au sérum son pouvoir hémolytique. Mais si l'on effectue une fixation préalable à 17° C, le sérum ainsi traité, non seulement conserve son complément, mais il ne peut plus désormais en être débarrassé par une nouvelle addition de zymosan à 37° C. Pillemer et coll. conclurent que la fixation du composant C'3 du complément sur le zymosan n'était possible qu'à condition qu'une autre substance soit présente. Cette substance a pu être isolée par fixation à 17° C sur le zymosan, suivie d'une élution et elle fut appelée properdine (du latin *perdere*, détruire, rappelant qu'elle est indispensable à la destruction de C'3 par le zymosan). C'est une euglobuline, de poids moléculaire élevé (plus de 1 million), contenant des traces de lipides, de glucides et de phosphore. Elle ne représente pas plus de 0,03% des protéines totales

du sérum. Elle précipite avec les autres euglobulines par dialyse à pH 5,5 et à basse concentration ionique. Sa mobilité électrophorétique est semblable à celle des gammaglobulines (68). Elle est détruite dans le sérum chauffé trente minutes à 56° C, mais elle résiste à des températures supérieures quand elle est purifiée et il faut atteindre des températures de 66° C pendant trente minutes ou de 100° C durant cinq minutes pour en assurer une destruction totale. Elle n'est pas altérée par la congélation et peut se conserver pendant des semaines à — 20° C. La properdine n'est pas détruite par l'hydrazine ou la trypsine, ni par l'élimination des ions divalents. Les complexes antigènes-anticorps ne la fixent pas, et elle n'intervient pas dans la réaction classique de déviation du complément (28 - 29).

La propriété la plus remarquable attribuée à la properdine fut une activité bactéricide, laquelle aurait requis pour se manifester deux cofacteurs indispensables, le complément et les ions magnésium (108). C'est pour cette raison que l'on parle le plus souvent du « système properdine » constitué par l'association properdine-complément-ions Mg^{++}. On a attribué à cet ensemble une activité microbicide vis-à-vis de nombreuses espèces bactériennes telles que *Salmonella, Escherichia, Shigella, Proteus.* Pillemer a ainsi rapporté que *Shigella dysenteriae* se trouvait tué par contact avec du sérum humain normal à 37° C, alors que les bactéries restent vivantes dans un sérum privé de properdine. Ce dernier retrouverait de nouveau son pouvoir bactéricide si on lui ajoute de la properdine. Pillemer pensait également avoir montré que l'intensité du pouvoir bactéricide d'un sérum était proportionnel à sa teneur en properdine à condition que le complément et les ions Mg^{++} soient présents en quantités optimales. Cependant toutes les souches d'une même espèce ne paraissaient pas également sensibles à l'action de la properdine. On a également attribué au système properdine une action anti-virus en utilisant en particulier le virus de la maladie de Newcastle (111), un rôle dans la lyse de certaines hématies fragiles de malades atteints d'hémoglobinurie paroxystique nocturne (50), un pouvoir protecteur contre les infections secondaires provoquées par une irradiation (96), une activité anti-protozoaire (46).

Cette découverte de la properdine parut permettre d'expliquer des observations parfois fort anciennes, apparemment ininterprétables par l'hypothèse de l'intervention d'anticorps spécifiques vrais. Déjà en 1893, Klein (54) avait observé que l'injection intrapéritonéale ou sous-cutanée de diverses bactéries tuées, protégeait les animaux d'expérience contre l'administration de vibrion cholérique normalement capable de déclencher une affection mortelle. Il ne peut s'agir ici d'anticorps spécifiques puisque le vaccin est de nature quelconque. De plus, le délai entre l'injection et l'apparition de la résistance est considérablement plus

court que celui que l'on observe dans la vaccination spécifique. Isaeff (51), puis Isaeff et Pfeiffer (84) avaient montré en 1894 que l'on pouvait protéger des cobayes contre des doses mortelles de vibrion cholérique par une injection intrapéritonéale préalable de bouillon, de peptone ou d'urine. Plus récemment, en 1955, Rowley (97) a établi que l'injection de parois d'*Escherichia coli* à la souris provoque tout d'abord dans un délai de deux heures après l'injection, un état de moindre résistance vis-à-vis d'une infection expérimentale, mais cette résistance est considérablement accrue si l'infection n'a lieu que vingt-quatre heures après. Landy et Pillemer (62) se penchèrent sur cette question et estimèrent qu'on assistait à un accroissement transitoire de la properdine dans les douze heures suivant l'injection de petites quantités de lipopolysaccharides. De nombreux constituants seraient ainsi capables d'augmenter la concentration humorale de la properdine. Ce seraient aussi bien les polysaccharides bactériens de pneumocoques que les complexes endotoxiques de bactéries à Gram négatif, ou des stromas d'érythrocytes, des dextranes ou des lévanes naturels de poids moléculaire élevé. Landy et Pillemer établirent un rapport entre l'augmentation du taux de properdine provoquée par l'injection d'une de ces substances et la résistance accrue de la souris vis-à-vis de doses tests de bactéries à Gram négatif (63). En fait, la relation de cause à effet n'a pas été démontrée, la corrélation entre properdine et résistance à l'infection n'étant pas toujours étroite. Chez certains animaux, le taux de properdine est simplement maintenu alors que la résistance est nettement augmentée. Cette question a été reprise par Rowley qui injecte des endotoxines ou des substances dérivées, marquées au phosphore 32. Il arrive à la conclusion que l'augmentation de résistance non spécifique qui prend place après injection de lipopolysaccharides d'origine bactérienne, tient moins à une surproduction de properdine qu'à une élévation de la phagocytose. L'immunité dans ce cas serait plus liée à des modifications cellulaires des phagocytes et des macrophages, qu'au taux de properdine.

A la suite de ces travaux, on a tenté d'identifier la properdine à l'« anticorps naturel », c'est-à-dire la considérer comme un anticorps formé dans l'organisme normal en réponse à des facteurs antigéniques de nature polyosidique, communs à de nombreuses bactéries. Si par sa nature chimique et son manque de spécificité la properdine se distingue des anticorps immunitaires, elle possède bien les caractères de l'« anticorps normal ». Tous deux ont besoin du complément au complet et d'ions Mg^{++}, tous deux fonctionnent dans des systèmes bactériolytiques ou hémolytiques en l'absence d'anticorps spécifiques, tous deux sont thermolabiles. Cependant, Osawa et Muschel (81) ont montré qu'un sérum humain normal mis en contact avec des bactéries telles que

Shigella dysenteriae, est ensuite incapable d'exercer une action bactéricide sur ces mêmes bactéries et ceci bien que le taux de complément et de properdine n'ait pas varié. Selon ces auteurs, le traitement préalable du sérum par les bactéries aurait permis à celles-ci de fixer l'« anticorps normal » du sérum, et la properdine, que l'on retrouve intacte, ne saurait être en aucun cas assimilée à lui. De plus, l'absorption répétée du sérum normal avec du zymosan provoque une diminution de l'activité bactéricide vis-à-vis de *Shigella dysenteriae*, mais non une complète inactivation, bien que l'activité de la properdine ne soit plus décelable. Osawa et Muschel n'hésitent pas à affirmer que le système properdine est inadéquat pour expliquer à lui seul l'action bactéricide et bactériolytique du sérum normal.

Si nous analysons les travaux de Pillemer, nous voyons qu'il a utilisé la faculté de fixation de la properdine sur le zymosan à 17° C pour l'isoler et en étudier les particularités physico-chimiques et immunologiques. Or, selon l'auteur lui-même, le sérum humain normal traité à 17° C par le zymosan conserve presqu'intégralement ses propriétés microbicides. Il est nécessaire de répéter le traitement à 37° C pour faire disparaître les propriétés bactéricides vis-à-vis des bactéries à Gram négatif. La conclusion normale eut été que le composant C'3 du complément, seul ou en présence de la properdine, est un élément essentiel de cette propriété. Pour maintenir la notion de l'activité microbicide de la properdine, Pillemer en vint à modifier les caractéristiques précédemment admises pour définir cette protéine et il admit qu'au moins dans certains sérums, il est nécessaire de pratiquer une absorption à 37° C pour l'éliminer complétement. Il y là une véritable pétition de principe qui est sans doute la cause des discordances observées entre les auteurs qui titrent la properdine par ses effets biologiques et en particulier par son prétendu pouvoir microbicide. C'est probablement aussi la raison des déconvenues rencontrées au point de vue thérapeutique par l'usage de la properdine, après les grands espoirs qu'elle a suscités.

En réalité, si l'existence de la properdine ne saurait être contestée, une relation entre le taux de properdine et l'état d'immunité non spécifique est plus que douteuse et un grand nombre d'auteurs s'accorde aujourd'hui pour dénier au « système properdine » un rôle primordial dans l'autarcèse.

Chapitre III

LE LYSOZYME

En 1922, Fleming découvrit dans les sécrétions nasales et dans les larmes un principe doué d'un pouvoir bactéricide énergique qu'il dénomma lysozyme. Très actif sur divers germes saprophytes de l'atmosphère, le lysozyme peut en dissoudre rapidement des quantités considérables. Une expérience spectaculaire consiste à ajouter une trace de sécrétions lacrymales à une suspension épaisse de germes sensibles pour obtenir en quelques instants une clarification complète de celle-ci. Dans la note originale relatant sa découverte (38), Fleming notant que le lysozyme est actif exclusivement sur des espèces non pathogènes, pensa que ce principe représente un des agents essentiels de la résistance de l'organisme aux infections bactériennes, au point que toute espèce résistante à l'enzyme est du même coup une espèce pathogène.

Fleming montra rapidement que le lysozyme est très répandu dans les sécrétions et les tissus animaux. On le rencontre dans les sécrétions nasales et lacrymales, la salive, le suc gastrique, le liquide céphalorachidien, le liquide synovial, le liquide amniotique. Les leucocytes en contiennent beaucoup mais le plasma sanguin n'en renferme que de petites quantités et, semble-t-il, seulement de manière épisodique; il n'apparaîtrait dans le sang qu'en conséquence de l'altération des leucocytes et ceci aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Dans les tissus, on le retrouve dans les cheveux, les ongles, le poumon, l'estomac, l'intestin, les glandes salivaires, la rate, le rein, le tissu conjonctif inflammatoire et dans de nombreux tissus végétaux. Signalons enfin qu'on le rencontre en énorme quantité dans le blanc d'œuf de poule. Malheureusement l'hypothèse de Fleming ne se confirma pas et depuis les travaux de Thompson en 1940 (106), l'importance du lysozyme dans l'autarcèse, c'est-à-dire dans la défense non spécifique de l'organisme contre l'infection, parut douteuse ou peu convaincante. On n'a pas réussi à démontrer l'existence d'une corrélation indiscutable entre le taux de lysozyme contenu dans les humeurs ou les tissus, et la résistance à l'infection. Les observations faites

sur la lyse bactérienne durant ces dernières années ont cependant permis d'émettre de nouvelles hypothèses.

Le lysozyme, depuis sa découverte par Fleming, a fait l'objet d'un nombre considérable de travaux. On sait aujourd'hui qu'il s'agit d'une protéine basique, de point isoélectrique situé entre 10,5 et 11, de poids moléculaire faible, de l'ordre de 14 800, très riche en arginine et possédant 5 ponts disulfure à l'intérieur même de la chaîne, sans groupement sulfhydryl libre. Le lysozyme est précipitable par les sels neutres et les solvants organiques, et donne avec certains acides organiques des sels définis insolubles, en particulier un picrate et un flavianate. Grâce à ces propriétés, on parvint rapidement à le purifier et à le cristalliser. En tant qu'enzyme, le lysozyme agit comme une hydrolase et plus particulièrement comme une béta-osidase, hydrolysant les liaisons osidiques de certains polysaccharides.

Si les études physico-chimiques faites sur le lysozyme en font actuellement l'une des protéines les mieux connues, sa fonction demeurait cependant obscure. Dès 1934, Meyer (74) formula l'idée que le lysozyme pourrait jouer un rôle dans le métabolisme des polysaccharides. Boasson en 1938 (8) déclare que le lysozyme ne dissout pas la paroi ectoplasmique des bactéries, mais qu'il ne fait que s'y fixer et en modifie la structure, ce qui permet au contenu de diffuser dans le milieu. La clarification du milieu contenant les bactéries devait être attribuée selon lui, à des changements d'indice de réfraction du contenu cellulaire. En 1954, Babudieri et Bietti (5) arrivent à la conclusion que le lysozyme digérait peu à peu le contenu cellulaire des bactéries sans rupture de la paroi. Les cellules digérées augmentent de volume et se vident de leur contenu. Kern et coll. (53) ont montré en 1951 que la paroi était bien altérée et que l'exosmose du cytoplasme s'en suivait. Mais selon eux, la paroi n'est pas complètement détruite et à la fin de la lyse, on retrouve celle-ci vidée de son contenu mais non dissoute.

Un autre groupe d'observateurs affirmait que l'action du lysozyme se limitait à l'attaque de la paroi qui finit par se dissoudre complètement, mais que le contenu cellulaire n'était pas modifié par l'enzyme. Les expériences de Salton en 1952 (98), par action du lysozyme sur des parois bactériennes obtenues par désintégration mécanique suivie de centrifugation différentielle, montrent que celles-ci sont complètement dissoutes et qu'il ne subsiste aucune structure résiduelle.

La synthèse de ces deux théories, en apparence contradictoires, a été faite en 1957 par Colobert et Lenoir (26) en utilisant le *Micrococcus lysodeikticus*. La clarification des substances microbiennes sous l'influence du lysozyme est la résultante de deux phénomènes, d'une part la destruction de la paroi ectoplasmique qui est une action enzymatique et d'autre part la dispersion consécutive et la solubilisation du protoplasme,

régies simplement par les conditions physico-chimiques. La masse protoplasmique dépouillée de la paroi perd peu à peu sa cohésion, se disperse dans le milieu sous forme de granules, qui eux-mêmes finissent par se solubiliser complètement. La lyse est alors achevée. Le substrat du lysozyme contenu dans la paroi de *Micrococcus lysodeikticus* a pu être isolé. Colobert et Dirheimer (22) ont établi qu'il s'agit d'un glycopeptide contenant du glucose, de la glucosamine, de l'acide muramique, de l'acide glutamique, de l'alanine, de la lysine et du glycocolle.

Les bactéries capables de se lyser directement sous l'influence du lysozyme sont cependant très peu nombreuses. Pratiquement elles appartiennent toutes aux genres *Sarcina* — auquel appartient *Micrococcus lysodeikticus* — et *Bacillus*. Le lysozyme a provoqué un renouveau d'intérêt lorsque l'on s'est rendu compte que de nombreuses bactéries et en particulier des bactéries à Gram négatif, contiennent dans leurs parois un substrat du lysozyme et ceci bien qu'elles ne soient pas lysables directement.

Paroi bactérienne et substrat du lysozyme

Les travaux de ces dernières années ont amené des progrès importants dans la connaissance de l'organisation et de la structure de la paroi ectoplasmique des bactéries. On a réussi à identifier des constituants macromoléculaires qui paraissent jouer un rôle fondamental dans l'architecture pariétale. Le premier est un chaînon glycopeptidique. On s'est aperçu que les éléments les plus caractéristiques de la paroi, acide muramique, acide diaminopimélique et certains isomères D des acides aminés entraient dans la constitution de composés glycopeptiques d'un type très particulier, que l'on peut isoler aussi bien des bactéries à Gram positif que des bactéries à Gram négatif. Dans le premier cas, le glycopeptide contient de l'alanine, de l'acide glutamique, et soit de l'acide diaminopimélique, soit de la lysine avec parfois du glycocolle, de l'acide aspartique ou de la sérine et un constituant hexosaminique contenant de la glucosamine, de l'acide muramique et dans certains cas de la galactosamine. Dans le cas des bactéries à Gram négatif, le glycopeptide est constitué d'acide diaminopimélique, d'acide glutamique et également de glucosamine et d'acide muramique. Ce glycopeptide, présent dans la paroi de toutes les bactéries, est l'élément fondamental de la structure pariétale. Il peut servir de substrat à de nombreuses hydrolases et en particulier c'est au niveau de cet élément responsable de la rigidité de la paroi qu'agit le lysozyme.

Dans le cas des bactéries à Gram négatif intervient un deuxième constituant macromoléculaire qui joue un rôle architectural important dans la paroi. Ce deuxième constituant est représenté par les antigènes somatiques complets ou endotoxines. C'est le composant pondéralement

le plus important de la paroi. On estime en effet que la paroi des bactéries à Gram négatif est constituée pour 80% de son poids par l'antigène somatique et pour les 20% restant par le matériau contenant le glycopeptide pariétal, homologue à celui qui constitue la paroi des bactéries à Gram positif. Boivin et Mesrobeanu (9) réussirent les premiers a isoler l'endotoxine des bactéries. Depuis, de nombreuses techniques ont été mises au point, permettant un isolement des parois et la préparation des antigènes somatiques à partir des bactéries à Gram négatif (76 - 82, 88 - 112). L'étude des constituants des divers complexes antigèniques isolés a montré que l'on trouve des complexes glucido-lipido-polypeptidiques. Des travaux importants ont été consacrés aux lipides des bactéries à Gram négatif et tout spécialement aux lipides constitutifs de l'endotoxine. En dosant ces derniers, obtenus à partir d'*Escherichia coli*, Salton (99) a observé des valeurs de 8,2, 8,6 et 22% de lipides selon le mode de traitement des parois. Créach (27) en utilisant un mode de préparation des parois d'*Eberthella typhosa* par trypsination, indique un taux de 30% dans le produit isolé. Cette importante quantité de lipides suggère que ces substances jouent un rôle essentiel dans la structure de la paroi et Salton a déclaré à ce propos: « La haute teneur en lipide des parois des bactéries à Gram négatif conduit à penser que ceux-ci se comportent comme un ciment pour la mosaïque des molécules protéiques » (100).

Les travaux de Créach (27) et de Créach et Colobert (21) portant sur la structure de la paroi ectoplasmique d'*Eberthella typhosa 0-901*, permettent de schématiser cette paroi sous forme de deux couches superposées. La couche interne, mince, est responsable de la rigidité. C'est elle qui est hydrolysable par le lysozyme. Elle constitue un réseau de mailles enserrant le protoplasme, réseau constitué par le glycopeptide riche en acide muramique et en galactosamine, et lié par des lipides. La couche externe est essentiellement constituée par l'antigène somatique complet, directement accessible aux anticorps. Elle est formée de complexes glucido-lipido-polypeptidiques, dont la teneur en lipides est particulièrement élevée. Chez les bactéries à Gram négatif, l'endotoxine masque la couche interne et la protège de l'action du lysozyme.

Lyse bactérienne indirecte par le lysozyme

Le substrat du lysozyme, présent dans la paroi des bactéries à Gram négatif mais normalement inaccessible à l'enzyme, peut être démasqué par des traitements spéciaux. Il est remarquable de voir que si l'on soumet les bactéries à Gram négatif à l'un de ces traitements, le lysozyme est ensuite capable d'entraîner une lyse tout à fait analogue à celle que l'on peut observer directement sur les germes du genre *Sarcina* ou *Bacillus*. Les procédés qui peuvent être utilisés pour obtenir ce résultat

sont très divers. Grula et Hartsell (47) en faisant agir le lysozyme à pH 3,5 puis en élevant brusquement le pH à 10 à l'aide de soude, ont obtenu la lyse de 22 espèces de bactéries à Gram négatif, appartenant à 11 genres différents. Hartsell observe la lyse de diverses *Salmonella* et d'*Escherichia coli* par action concomitante du butanol avec le lysozyme (49). De même, des traitements par l'acétone (109), le chloroforme (107), une substance tensioactive comme le teepol (20), l'exposition aux rayons ultraviolets (2), l'action ménagée de la chaleur (17), sensibilisent de nombreuses espèces de bactéries pathogènes à l'action du lysozyme. L'emploi de la polymyxine (110) a permis également de conditionner des bactéries non directement lysables par le lysozyme. Un autre procédé efficace consiste dans le traitement des micro-organismes à l'aide du sel sodique de l'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA ou complexon III) en tampon trihydroxyaminométhane (89) ou à l'aide d'une résine échangeuse de cations telle le Dowex 50 (90).

Hypothèses sur l'intervention du lysozyme dans l'autarcèse

A la lumière de tous ces travaux, l'hypothèse de Fleming sur le rôle du lysozyme dans la résistance de l'organisme aux infections redevint d'actualité. On peut en effet se demander si *in vivo*, une sensibilisation convenable obtenue par un procédé encore inconnu, ne serait pas susceptible de rendre les bactéries pathogènes sensibles à l'action du lysozyme. Ce dernier dans un deuxième temps, provoquerait la lyse des parois et la destruction concomitante de la bactérie.

Les travaux d'Amano et de ses collaborateurs (1) fournissent des arguments en faveur de cette hypothèse. Ils rapportent que le système anticorps spécifique et complément est incapable de provoquer la lyse des bactéries en l'absence de lysozyme. Ils déclarent que le lysozyme seul ne peut attaquer la surface d'*Escherichia coli*, ni ses parois, bien que celles-ci contiennent le substrat du lysozyme. Tout se passe comme si ce dernier était démasqué ou activé par action de l'anticorps combinée à celle du complément. Malheureusement une description incomplète de ces expériences les rend difficilement reproductibles. De plus, il semble que l'usage de sérum normal n'a jamais été utilisé par les auteurs à la place de l'antisérum spécifique et il n'est donc pas possible d'éliminer l'intervention d'un facteur sérique autre que les anticorps. Récemment Muschel, Carey et Baron ont signalé la présence de lysozyme dans les préparations purifiées de properdine. Ces auteurs n'hésitent pas à attribuer toute l'activité de la properdine à celle du lysozyme qui en ferait partie intégrante (78).

On peut remarquer avec Colobert (19) que dans les études faites *in vitro* à l'aide de bactéries à Gram négatif, d'une part les traitements par chauffage, le teepol ou l'EDTA ont pour effet de détacher des quantités

importantes de lipides de la surface bactérienne et que d'autre part, les différents procédés reconnus efficaces par d'autres auteurs font tous appel à des solvants des lipides. Le mécanisme de la sensibilisation des bactéries au lysozyme qui consisterait en un arrachage de l'endotoxine riche en lipides, ne pourrait-il être *in vivo* sous la dépendance de certaines lipases? Bien que l'intervention *in vivo* d'un tel facteur sensibilisant soit purement hypothétique, on peut se demander si certaines lipases et en particulier la lipoprotéine-lipase du sérum, ne seraient pas susceptibles de jouer ce rôle. Ainsi, cette lipoprotéine-lipase pourrait être responsable d'un processus lipolytique amenant, sinon la dissolution complète de la paroi bactérienne, du moins le démasquage de la couche glycopeptique interne. Cette dernière, mise à nue, serait accessible au lysozyme ou à un autre facteur lytique présent dans le sérum normal et entraînant la lyse complète de la bactérie. La lipoprotéine-lipase entrerait alors dans le cadre d'un système immunitaire bactériolytique. C'est là une hypothèse de travail que nous avons cherché à vérifier. Avant d'aborder le détail de nos travaux nous passerons rapidement en revue les connaissances actuelles sur ce facteur.

Chapitre IV

LA LIPOPROTÉINE-LIPASE

En 1943, Hahn (48) observa pour la première fois que l'injection à des chiens lipémiques de sang auquel on avait ajouté de l'héparine comme anticoagulant, provoquait un éclaircissement rapide de leur plasma. Cinq minutes après l'injection, les prélèvements sanguins pratiqués chez ces chiens apparaissaient limpides. Il vérifia en plus que l'injection d'héparine seule a le même effet. Ces travaux furent repris en 1950 par Anderson et Fawcett (3) qui indiquèrent que le plasma d'un animal auquel on a injecté auparavant de l'héparine, contenait une substance active capable après incubation *in vitro*, de clarifier un plasma lipémique. Le rôle possible de ce facteur dans le transport des lipides et la recherche d'une corrélation entre celui-ci et l'athérosclérose ont fait l'objet d'un nombre considérable de publications.

Bien que de nombreuses questions restent encore sans réponse, un certain nombre de faits paraissent actuellement acquis. Après l'injection d'héparine, un enzyme, la lipoprotéine-lipase apparaît en forte proportion dans le sang. On peut suivre l'action de cette lipase par la décroissance de la turbidité d'un plasma lipémique. Il a été démontré que cette clarification des graisses était la manifestation visible d'une réduction rapide de la concentration des lipoprotéines sériques de faible densité. Pendant cette transformation, on assiste à une libération d'acides gras, signe d'un processus lipolytique. Shore et collaborateurs (105) ont ainsi montré que durant la clarification d'une préparation de lipoprotéines par la lipoprotéine-lipase, il y avait parallèlement augmentation de la concentration en acides gras libres et diminution de la concentration des triglycérides. On sait qu'une partie des lipides du sérum sanguin forme des associations intimes avec les protéines. On a ainsi isolé quatre classes de lipoprotéines solubles. Seules les lipoprotéines dont la constante de sédimentation est supérieure à 10 S peuvent servir de substrat à la lipoprotéine-lipase (58). Dans le sang lipémique les microchylons forment une cinquième classe de lipoprotéines. Ils sont responsables de la turbidité des sérums lipémiques et constituent un substrat très pratique pour

la mesure de l'activité de la lipase (95). Mais en plus de ces microchylons et des lipoprotéines solubles, de simples émulsions de triglycérides peuvent servir de substrat, à condition toutefois qu'elles soient en présence d'une petite quantité d'alpha-lipoprotéines (113). De même, on a montré que les lipoprotéines du jaune d'œuf et celles du lait (102) sont attaquées par l'enzyme.

On a réussi a extraire la lipoprotéine-lipase d'un certain nombre de tissus. Le cœur et le tissu adipeux en contiennent une très forte quantité. Si elle apparaît en forte proportion dans le plasma post-héparinique, certains auteurs ont signalé la présence de l'enzyme en quantité significative dans le torrent circulatoire sans injection d'héparine (36 - 40). Nikkila (79) a trouvé une activité dans le précipité d'euglobulines d'un mélange de sérums humains et Engelberg indique que l'on peut observer une clarification d'un substrat à base d'huile de sésame par l'action de plasmas humains normaux (35).

Les conditions d'action de la lipoprotéine-lipase ont été précisées. On a montré que les acides gras libérés par l'hydrolyse des lipides sont inhibiteurs de la réaction. Gordon (41) et Robinson (94) ont indiqué qu'on peut lever cette inhibition par addition d'albumines qui jouent le rôle d'accepteur des acides gras libérés. L'enzyme est également inhibé par des concentrations en chlorure de sodium de 0,35 à 1 M (14 - 57), par les cations divalents (60) et par le sulfate de protamine que l'on peut considérer comme un inhibiteur spécifique (14 - 57). Ce dernier point peut être rapproché du fait que la lipoprotéine-lipase est inactivée par une héparinase bactérienne (59), ce qui indique qu'elle doit contenir comme partie intégrante de sa molécule enzymatique un mucopolysaccharide identique ou voisin de l'héparine. Le complexe que la protamine est capable de former avec l'héparine pourrait ainsi expliquer cette inhibition. Si l'injection d'héparine est capable de faire apparaître une forte proportion de lipoprotéine-lipase dans le sang circulant, *in vitro* son action est toute différente. Korn (56 - 57) a signalé un rôle activateur de l'héparine, mais uniquement pour des préparations d'enzyme à partir de tissu cardiaque. Robinson (93) rapporte que la lipoprotéine-lipase du plasma est plus sensible à la chaleur après passage sur un échangeur d'anion qui enlève complètement l'héparine libre du plasma. Par addition d'héparine à l'éluat, l'enzyme retrouve sa stabilité première. Brown (14) indique que la clarification des lipoprotéines est inhibée par l'héparine lorsque l'on ajoute celle-ci *in vitro* à des préparations de l'enzyme. A la concentration de $3{,}8.10^{-6}$ M, l'héparine entraîne une inhibition de 75 pour cent et à celle de $3{,}8.10^{-4}$ M, l'inhibition atteint 89 pour cent. Signalons enfin que la lipoprotéine-lipase est thermolabile. Elle est entièrement inactivée par un chauffage de dix minutes entre 50 et 60° C (4 - 105).

Chapitre V

L'OBSISTINE

Un facteur lytique apparemment nouveau, actif sur diverses espèces bactériennes à Gram négatif, a été individualisé ces dernières années dans le sérum humain normal. Ce facteur a été provisoirement désigné par Colobert et Kirn sous le nom d'obsistine, du latin *obsistere*, s'opposer, faisant ainsi allusion à son rôle éventuel dans la défense de l'organisme (23).

L'existence de ce facteur lytique peut être démontrée par la lyse d'une suspension bactérienne réalisée en tampon phosphate, en présence de sérum humain normal. Les propriétés lytiques de l'obsistine ont été étudiées par l'observation photométrique de suspensions bactériennes, conjuguées à des observations morphologiques au microscope optique et au microscope électronique. En se plaçant dans des conditions définies et en particulier en présence d'ions phosphates, on voit la densité optique d'une suspension bactérienne, réalisée par exemple à l'aide de la souche *Eberthella typhosa 0-901*, diminuer progressivement au contact de sérum humain normal. La lyse se poursuit pendant une heure environ, mais n'aboutit pas à une clarification totale de la suspension, la valeur de l'opacité résiduelle dépendant des conditions expérimentales, en particulier de la concentration en bactéries et de la dilution du sérum. L'examen au microscope optique à contraste de phase montre qu'au bout de quelques minutes, un grand nombre de bactéries se transforment en éléments sphériques réfringents. Ces éléments sont semblables à ceux que l'on peut obtenir sous l'influence de divers facteurs tels que la pénicilline, le lysozyme et que Mac Quillen a proposé de désigner sous le nom de sphéroplastes. Après ces transformations, on assiste à une diminution de la réfringence de tous les éléments. Les sphéroplastes semblent se vider de leur contenu, deviennent de plus en plus difficiles à observer et finalement disparaissent. Au bout d'une heure environ, 50 à 80 pour cent des bactéries ont ainsi disparu et il ne subsiste plus, à côté de quelques-unes qui ont conservé leur forme, que quelques sphéroplastes à contour flou. Ces observations ont été précisées au microscope électro-

nique. On observe d'abord un éclaircissement par zone du protoplasme, puis apparaissent les sphéroplastes. La transparence aux électrons ne cesse d'augmenter aussi bien chez les bactéries qui ont conservé leur forme initiale que chez celles qui se sont transformées. On note une altération des parois ectoplasmiques, le contour des bactéries et des sphéroplastes devient flou, l'épaisseur s'amenuise peu à peu. On assiste à une fonte progressive de la paroi qui finit par se dissoudre complètement.

Un certain nombre de caractères et de conditions d'action de l'obsistine ont été précisés. Ainsi, il faut pratiquer une dilution du sérum normal pour observer la lyse d'une suspension bactérienne. Dans les sérums très actifs purs ou insuffisamment dilués, le facteur lytique est totalement inhibé. D'autre part, l'activité lytique s'accroît en présence d'ions phosphates. Ce même phénomène s'observe en utilisant un tampon véronal ou en présence du sel sodique de l'acide éthylène diamine tétracétique. Cette activité est à mettre en relation avec la chélation de certains ions et on a démontré que les ions Ca^{++} et Mg^{++} sont inhibiteurs de l'activité lytique de l'obsistine. L'obsistine est très thermolabile, un chauffage de trente minutes à 56° C ou de une heure à 50° C détruit toute activité. En étudiant la spécificité de ce facteur, on peut voir qu'il se montre actif sur diverses Salmonelles, mais non sur toutes. Ainsi *Eberthella typhosa*, *Salmonella para A*, *Salmonella para B*, *Escherichia coli* (*mutabile*) sont lysés mais non pas *Salmonella para C* ni *Salmonella enteritidis*. D'autres bactéries à Gram négatif sont sensibles, telles *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, mais l'obsistine n'agit pas sur *Shigella sonnei*, ni sur *Proteus mirabilis*. Le pH optimum pour observer la lyse de ces diverses espèces se trouve situé au voisinage de 7. En dialysant le sérum normal contre du tampon acétate de sodium-acide acétique 0,02 M, pH 5,5 on voit que l'obsistine est constituée d'au moins deux composants, également thermolabiles, l'un précipitant avec les euglobulines, l'autre demeurant en solution avec les autres protéines.

On a tenté d'identifier ce facteur lytique à un système bactériolytique connu. Colobert et Kirn ont été ainsi amenés à comparer les propriétés de l'obsistine à celles du lysozyme, de la properdine, du complément et des anticorps (23). La présence de lysozyme dans le sérum humain peut se mettre en évidence par la lyse de *Micrococcus lysodeikticus*. Cette activité très spécifique persiste intégralement après un chauffage du sérum trente minutes à 56° C alors que l'activité lytique vis-à-vis d'*Eberthella typhosa* disparaît complètement. Une absorption du lysozyme sur *Micrococcus lysodeikticus* ne modifie pas la lyse de la bactérie d'épreuve. Les deux facteurs paraissent donc différents. Il en est de même si l'on compare les propriétés de l'obsistine et de la properdine. Cette dernière s'extrait facilement du sérum en se fixant sur le zymosan

à 17° C en soixante-quinze minutes. Or, en effectuant deux absorptions consécutives du sérum sur le zymosan, on ne constate aucune diminution du pouvoir lytique vis-à-vis d'*Eberthella typhosa*. De plus, l'ion Mg^{++} est indispensable à l'activité de la properdine alors qu'il se comporte comme un inbibiteur vis-à-vis de l'obsistine. L'obsistine est tout à fait distincte du système qui entre en jeu dans la bactériolyse spécifique. Celle-ci nécessite un facteur thermostable, l'anticorps, et un facteur thermolabile, le complément. Si dans le cas de l'obsistine nous sommes en présence également d'au moins deux composants, ceux-ci sont tous les deux thermolabiles. D'autre part, les essais pour reconstituer un système bactériolytique pour la souche d'*Eberthella typhosa 0-901*, en conjuguant l'action d'anticorps spécifiques d'homme ou de lapin et de sérum frais de cobaye, sont toujours restés négatifs. Le rôle éventuel des anticorps dans l'activité lytique de l'obsistine a pu être complètement exclu en saturant *Eberthella typhosa* par des anticorps spécifiques provenant d'un immunsérum de lapin agglutinant au 1/80 000 et d'un sérum de convalescent de typhoïde agglutinant au 1/800. Les bactéries centrifugées, lavées et remises en suspension dans du sérum humain normal, sont lysées exactement comme les bactéries témoins. En particulier, on n'observe dans ces conditions aucune accélération de la vitesse ni d'augmentation de l'intensité de la lyse. L'intervention du complément dans le système lytique de l'obsistine a été étudié à l'aide de sérum frais de cobaye. Celui-ci ne possède aucune activité lytique vis-à-vis des bactéries d'épreuve et son addition à du sérum humain normal n'active nullement la lyse de ces dernières, mais au contraire la ralentit. D'autre part, l'addition de complément à un sérum chauffé à 56° C ne lui restitue pas son activité lytique. Il semble donc que le complément ou tout au moins le sérum frais de cobaye qui est la source habituelle de complément en pratique courante, n'intervienne pas dans son ensemble dans la lyse observée à l'aide de l'obsistine.

On peut par contre admettre une certaine similitude entre l'obsistine et les bactériolysines non spécifiques du sérum, dont l'existence est connue depuis fort longtemps, et en particulier l'alexine telle qu'elle a été décrite à l'origine par Buchner, facteur bactériolytique non spécifique vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et présent dans les sérums normaux. On peut citer à ce propos les termes de Kolle et Hetsch qui, en 1918, déclaraient dans leur traité de bactériologie expérimentale (55): « Bien que le sang puisse contenir à l'état normal des substances capables d'exercer une action dissolvante sur les bactéries, on réserve généralement le nom de bactériolysines aux bactériolysines spécifiques. En effet, la spécificité n'est pas un caractère des bactériolysines du sang normal, qui peuvent agir sur les espèces bactériennes les plus diverses; mais c'est d'elles cependant que dérivent les bactériolysines spécifiques

car elles ont les unes et les autres la même constitution. » Malheureusement ainsi que nous l'avons souligné dans notre premier chapitre, l'étude des facteurs lytiques non spécifiques a été négligée au profit des bactériolysines spécifiques et l'imprécision des observations déjà fort anciennes ne permet pas de savoir dans quelle mesure l'obsistine peut être identifiée à l'un de ces facteurs.

Le rôle de l'obsistine dans l'autarcèse n'est pas encore élucidé. Diverses expériences montrent cependant que l'obsistine intervient dans l'immunité acquise par la vaccination. Colobert et Coll. (25) ont établi dans une étude sur des singes (*Cynocephalus babuin*) que l'obsistine participe de manière active à la réaction de l'organisme contre une tentative d'infection *per os* à l'aide de Salmonelles, d'une manière analogue mais non parallèle aux anticorps agglutinants et au pouvoir de séroprotection contre l'infection expérimentale de la souris. De même, les injections de vaccins antityphoparatyphoïdiques A et B suscitent à la fois une élévation progressive et considérable du taux de l'obsistine, l'apparition d'anticorps spécifiques agglutinants à un titre faible et le développement d'un pouvoir de séroprotection vis-à-vis de l'infection expérimentale de la souris. Mais si ces trois phénomènes sont en corrélation, il n'existe cependant pas de parallélisme entre eux. Ainsi la persistance des anticorps agglutinants paraît bien plus durable que celle du pouvoir de séroprotection qui disparaît en un mois et demi et que celle de l'obsistine qui se retrouve à sa valeur initiale trois mois et demi environ après la dernière injection. Si l'on effectue une inoculation *per os* à des animaux préalablement vaccinés, on observe une élévation plus intense et plus précoce de l'obsistine chez ceux-ci que chez les animaux témoins. Un autre phénomène a été constaté par injection de l'association des vaccins antipoliomyélitique et antityphoparatyphoïdique A et B aux animaux d'expérience. La montée du titre en obsistine est ici beaucoup moins marquée que celle observée chez les animaux qui ont reçu le vaccin antityphoparatyphoïdique seul (24).

Deuxième Partie

RECHERCHES PERSONNELLES

Essai d'identification de l'obsistine à la lipoprotéine-lipase

Essai d'isolement des différents facteurs intervenant dans l'activité lytique de l'obsistine

Chapitre VI

TITRAGE DE L'ACTIVITÉ LYTIQUE

Sérums sanguins

Les sérums utilisés dans notre travail sont obtenus à partir de sujets adultes sains et pour lesquels on n'a pas dans les antécédents, la notion d'une infection typho-paratyphique ni d'une vaccination récente. On a toujours opéré sur le mélange des sérums d'environ quinze donneurs, de façon à limiter les variations individuelles d'un donneur à l'autre. La séparation du caillot est en général pratiquée vingt-quatre heures après le prélèvement sanguin. Le sérum est ensuite conservé à la glacière à + 4° C, sans précautions particulières, ou congelé à — 20° C si son utilisation ne doit avoir lieu que quelques jours après le prélèvement.

Bactérie d'épreuve

La bactérie d'épreuve employée dans les systèmes lytiques est la souche 0-901 d'*Eberthella typhosa*, dont la formule antigénique est 9, 12_1, 12_2, 12_3. Elle ne possède pas d'antigène Vi, mais de petites quantités d'antigène flagellaire. Les bactéries sont cultivées sur gélose ordinaire. Après environ seize heures, on récolte la culture à l'aide de tampon phosphate 0,066 M, de pH 7,2. [Po_4HNa_2, $12H_2O$ = 16,717 g et Po_4H_2K = 2,723 g pour 1 000 ml d'eau distillée]. On centrifuge et on lave deux fois les bactéries à l'aide de ce même tampon. On les met finalement en suspension et on ajuste cette dernière de telle manière que diluée au quart dans le tampon, sa densité optique à 700 mμ dans une cuve de un centimètre d'épaisseur, soit égale à 0,83.

Epreuve qualitative d'activité lytique

Pour éprouver l'activité lytique d'un sérum ou d'une fraction protéique isolée, nous avons toujours opéré de la manière suivante: On

introduit dans des tubes à hémolyse une quantité fixe des divers échantillons à éprouver (généralement 0,5 ml ou 1 ml). On complète à un volume de 3 ml à l'aide de la solution de tampon phosphate 0,066 M et on ajoute à tous les tubes 1 ml de suspension bactérienne préparée comme indiqué précédemment. On déclenche un chronomètre au moment où l'on place ceux-ci dans un bain-marie réglé à 37° C et on mesure la densité optique de la suspension de dix minutes en dix minutes jusqu'à ce que l'on n'observe plus de variations significatives de celle-ci. Pour nous mettre à l'abri d'une bactériolyse due à une autre cause que le facteur que nous étudions, nous ajoutons à chaque série d'essais un tube contenant la même quantité de sérum, mais inactivé vingt minutes à 56° C, et un tube-témoin de suspension, constitué de 1 ml de suspension bactérienne et de 3 ml de tampon phosphate.

Épreuve quantitative, titrage de l'obsistine

Il existe une zone de dilution du sérum pour laquelle on peut trouver une proportionnalité entre la quantité de sérum introduite dans le milieu réactionnel et l'intensité de la lyse bactérienne. On peut ainsi définir une unité conventionnelle d'activité lytique que nous appellerons unité obsistine et qui s'exprimera par la pente de la droite expérimentale obtenue en portant en abscisses les dilutions de sérum et en ordonnées les densités optiques. Pour effectuer un titrage de l'obsistine, on procède de la façon suivante. Dans une série de tubes à hémolyse, on distribue respectivement 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 et 1 ml de sérum ou de solution à titrer. On complète à un volume de 3 ml à l'aide de tampon phosphate. On place dans un bain-marie réglé à 37° C, le flacon contenant la suspension bactérienne et les tubes contenant les différentes dilutions. Lorsque l'équilibre de température est réalisé, on ajoute 1 ml de la suspension bactérienne dans chaque tube et on homogénéise le contenu. Après exactement trente minutes, on agite et on note la densité optique de la suspension dans les différents tubes, à 700 mμ. Celle-ci doit être égale à 0,78 dans le tube-témoin n'ayant pas reçu de sérum. Sur un papier millimétré, on porte en abscisses les volumes de sérum ou de solution utilisés et en ordonnées les densités optiques correspondantes lues à la trentième minute. Habituellement, tous les points obtenus ne sont pas alignés, mais dans les sérums normaux où l'activité lytique est toujours assez faible, on trouve en général trois ou quatre points successifs alignés, permettant de tracer une droite. S'il n'en est pas ainsi, on reprend le titrage en utilisant des volumes de sérum ou de solution protéique plus faibles de 0,02, 0,05, 0,1, 0,2 et 0,25 ml. On calcule alors la pente de la droite expérimentale ainsi obtenue, en exprimant l'intensité de la lyse bactérienne en densité optique et les volumes de sérum impliqués dans la réaction en ml. Pour éviter que les valeurs calculées

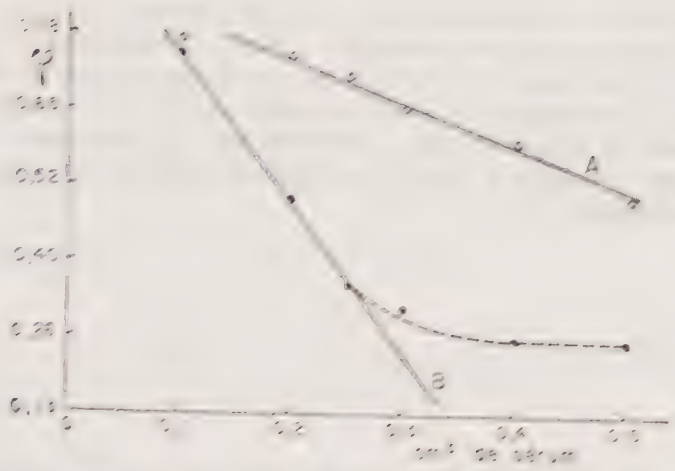

Fig. 1 - Tirage de l'activité lytique d'un sérum. En abscisses les volumes de sérum introduits dans la réaction. En ordonnées la densité optique de la suspension bactérienne au bout de trente minutes à 37° C.

soient trop petites, on multiplie le résultat par un coefficient arbitraire égal à 10. Si φ représente la densité optique à la trentième minutes pour un volume V_1 de sérum et φ_2 la densité optique correspondant à un volume V_2, le titre T d'obtention du sérum par ml est donné par la formule:

$$T = \frac{\varphi - \varphi_2}{V_2 - V_1} 10$$

A titre d'exemple, on peut lire sur la courbe A de la figure 1 une densité optique de 0,73 pour un volume de 0,2 ml de sérum et une densité optique de 0,52 pour 0,5 ml de sérum. Le titre en obtention sera de:

$$10 \frac{0,73 - 0,52}{0,5 - 0,2} = 7 \text{ unités par ml.}$$

Dans le cas de la courbe B, en prenant les densités optiques correspondantes aux valeurs 0,3 et 0,1 ml, nous obtenons un titre d'activité lytique de:

$$10 \frac{0,75 - 0,23}{0,3 - 0,1} = 26 \text{ unités par ml.}$$

Le photomètre que nous avons utilisé pour les mesures courantes de routine est un photomètre tricellule Jobin et Yvon équipé de l'écran sélectif 70. Cet appareil n'indique pas les densités optiques, mais des valeurs proportionnelles. Il suffit de multiplier les valeurs notées par un coefficient de proportionnalité déterminé une fois pour toutes par un étalonnage préalable, à l'aide d'un appareil indiquant directement les densités optiques.

Chapitre VII

ESSAI D'IDENTIFICATION DE L'OBSISTINE À LA LIPOPROTÉINE-LIPASE

En suivant la bactériolyse non spécifique au microscope électronique, on voit que les bactéries se transforment rapidement en sphéroplastes et qu'ensuite intervient une altération plus marquée de la paroi, une véritable fonte progressive qui aboutit à une dissolution complète de la paroi ectoplasmique et à une libération consécutive des restes du protoplasme. Or, l'étude du mécanisme de la clarification des sérums lipémiques postalimentaires chez l'homme et chez les animaux a amené la découverte dans le sang d'un enzyme, la lipoprotéine-lipase, capable d'hydrolyser les lipides sériques à condition que ceux-ci soient adsorbés sur un support protéinique. Les nombreux travaux de ces dernières années sur la composition et la structure de la paroi bactérienne nous ont amené à soulever l'hypothèse de l'intervention de cet enzyme dans la lyse bactérienne. En effet, la paroi des bactéries à Gram négatif est riche en lipides et on peut imaginer que leur destruction ou leur élimination par un processus lipolytique où interviendrait la lipoprotéine-lipase, entraînerait la dislocation de la paroi et une lyse consécutive. Dans cet esprit, nous avons tenté d'identifier l'obsistine à la lipoprotéine-lipase, les deux produits paraissant présenter de nombreux caractères communs.

Nous avons entrepris une série d'expériences découlant des connaissances actuelles de la lipoprotéine-lipase. On retrouve toute l'activité lipasique d'un sérum dans le précipité obtenu en amenant le pH d'une dilution sérique à la valeur 5,5. Nous avons recherché l'activité lytique d'une telle préparation. Le rôle stabilisateur et activateur de l'héparine ajoutée *in vitro* sur l'enzyme a été souligné par divers auteurs. Il nous a paru intéressant d'observer si l'héparine amenait une activation ou une stabilisation de l'activité lytique d'un sérum donné. Le taux maximum de lipoprotéine-lipase apparaît dans la circulation après injection d'héparine. Nous avons pratiqué une telle injection à un animal et nous

avons observé si, corrélativement à l'augmentation de la lipoprotéine-lipase, on pouvait noter un accroissement du taux d'obsistine. Le sulfate de protamine inhibe la lipoprotéine-lipase. En cas d'identité de cet enzyme et de l'obsistine, l'on devrait également noter une disparition de l'activité lytique d'un sérum. Toutes ces expériences que nous rapportons en détail, nous ont amené à la conclusion que l'hypothèse de l'identité des deux facteurs ne saurait être retenue.

Activité lytique d'un précipité contenant la lipoprotéine-lipase

Nikkila (79) a rapporté que l'on retrouve toute l'activité de la lipoprotéine-lipase dans le précipité obtenu en portant le pH d'une dilution sérique à 5,5. A partir d'un sérum humain présentant dans les conditions que nous avons définies, une forte activité lytique vis-à-vis d'une suspension d'*Eberthella typhosa 0-901*, nous avons pratiqué une précipitation isoélectrique à pH 5,5 selon la technique indiquée par Nikkila (79). Un volume de sérum est dilué vingt fois à l'aide d'eau distillée refroidie à 4° C. On amène le pH de cette dilution à la valeur 5,5 par addition lente d'une solution d'acide sulfurique N/100. Il faut avoir soin d'agiter après chaque addition d'acide pour éviter une acidité locale trop importante. Toutes les opérations se déroulent à 4° C. Après un repos d'une heure, on collecte par centrifugation le précipité formé. Le culot est redissout en tampon phosphate 0,066 M, de pH 7,2 et on ramène au volume initial de sérum. Cette solution protéique a été utilisée dans le système lytique au lieu et place du sérum d'origine. Une telle préparation ne montre pas d'activité lytique sur les bactéries d'épreuve.

Action de l'héparine sur l'activité lytique

Le rôle stabilisateur et activateur manifesté par l'héparine *in vitro* sur l'activité de la lipoprotéine-lipase a été souligné par divers auteurs. Nous avons recherché le comportement de l'obsistine en présence d'héparine. Un utilisant un sérum titrant 14 unités d'obsistine, nous avons ajouté des quantités croissantes d'héparine de 0,1 mg, 1 mg et 5 mg dans le milieu réactionnel. Nous avons ainsi pu observer une inhibition partielle de l'activité lytique pour des doses de 0,1 mg, alors que pour des quantités dix ou cinquante fois plus fortes, l'inhibition est totale. La figure 2 montre l'intensité de la lyse observée en fonction du temps pour les différentes quantités d'héparine utilisées.

Activité lytique d'un plasma post-héparinique

L'injection d'héparine fait apparaître une forte proportion de lipoprotéine-lipase dans le torrent circulatoire. S'il devait y avoir identité entre cet enzyme et l'obsistine, l'activité lytique d'un tel plasma post-

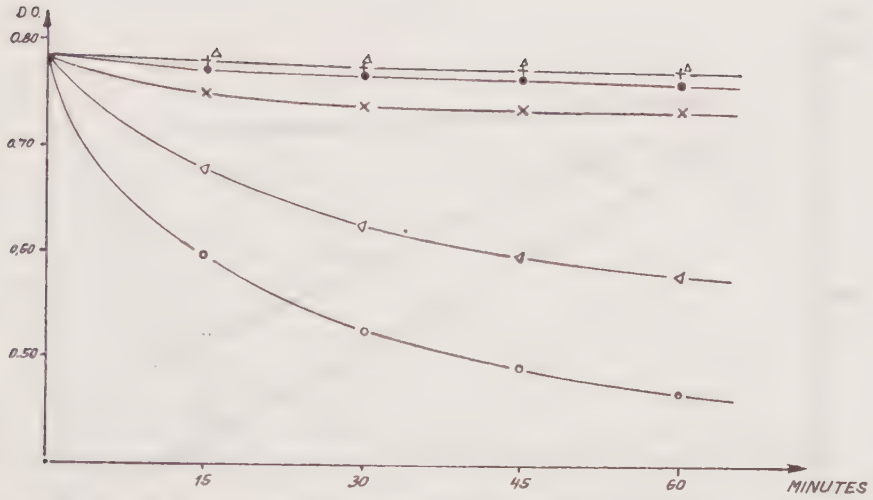

FIG. 2 - *Action de l'héparine sur l'activité lytique d'un sérum normal.*

○ = *système lytique témoin*
▽ = 0,1 *mg d'héparine*
× = 1 *mg d'héparine*
● = 5 *mg d'héparine*
\+ = *suspension bactérienne* + 1 *mg d'héparine*
△ = *sérum inactivé* + 1 *mg d'héparine.*

héparinique devrait être fortement accrue. Nous avons tenté de vérifier cette hypothèse en injectant de l'héparine à un animal et en titrant l'obsistine de son plasma avant et après injection. De plus, nous avons effectué une précipitation isoélectrique à pH 5,5 du plasma posthéparinique et nous avons titré l'obsistine d'une telle préparation. L'animal d'expérience choisi est le singe (*Cynocephalus babuin*) dont le plasma présente normalement une forte activité lytique. L'expérience a été faite sur un singe de 10 kilogrammes. On effectue un premier prélèvement sanguin sur oxalate de sodium (1 mg par ml de sang). Ce prélèvement permettra de connaître l'activité lytique du plasma de l'animal avant injection. On injecte ensuite à l'animal par voie intraveineuse 2,5 mg d'héparine par kg, soit 25 mg. Quinze minutes après cette injection on procède à une deuxième prise de sang sur le même anticoagulant que précédemment. Les deux échantillons de sang sont centrifugés de suite à 4° C. On récolte les plasmas. Une partie du plasma post-héparinique est précipitée en amenant le pH de la solution à la valeur 5,5 à l'aide d'acide sulfurique N/100. Le précipité redissout dans une solution tampon phosphatée, est ramené au volume de plasma de départ. On effectue un titrage de l'obsistine sur ces trois échantillons. Les résultats, exprimés en unités d'obsistine, sont portés dans la figure 3.

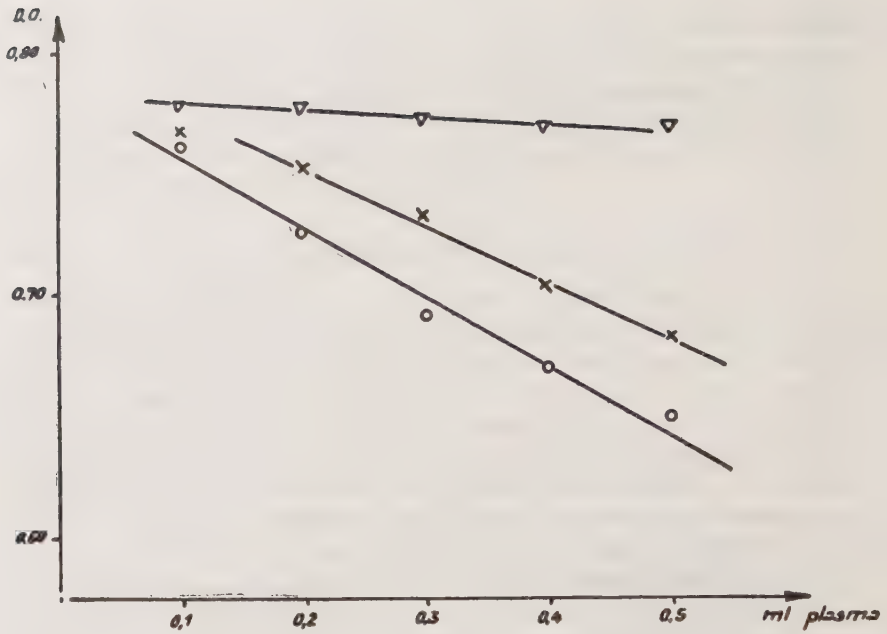

Fig. 3 - *Titrage de l'obsistine d'un sérum post-héparinique.*
○ = *plasma avant injection*
× = *plasma post-héparinique*
▽ = *précipité isoélectrique du plasma post-héparinique.*

On voit que l'activité lytique du plasma de l'animal avant injection d'héparine est de 3 unités d'obsistine et celle du plasma post-héparinique est de 2,5 unités. Quant au précipité obtenu à pH 5,5 il ne présente qu'une activité lytique très faible, de l'ordre de 0,16 unité d'obsistine.

Action du sulfate de protamine

Le sulfate de protamine est considéré comme un inhibiteur spécifique de la lipoprotéine-lipase. Nous avons étudié l'activité lytique d'un sérum sur une suspension d'*Eberthella typhosa*, en présence de quantités croissantes de sulfate de protamine. Quatre doses ont été utilisées: 0,5 mg, 1 mg, 2 mg et 5 mg. Afin de déterminer le rôle possible du sulfate de protamine seul sur les bactéries d'épreuve, nous avons à chaque fois effectué une réaction témoin à l'aide de sérum inactivé vingt minutes à 56° C et en présence des mêmes doses de sulfate de protamine. La lyse bactérienne a été suivie en fonction du temps. Les résultats rapportés dans la figure 4 nous montrent que le sulfate de protamine n'inhibe aucunement l'activité lytique.

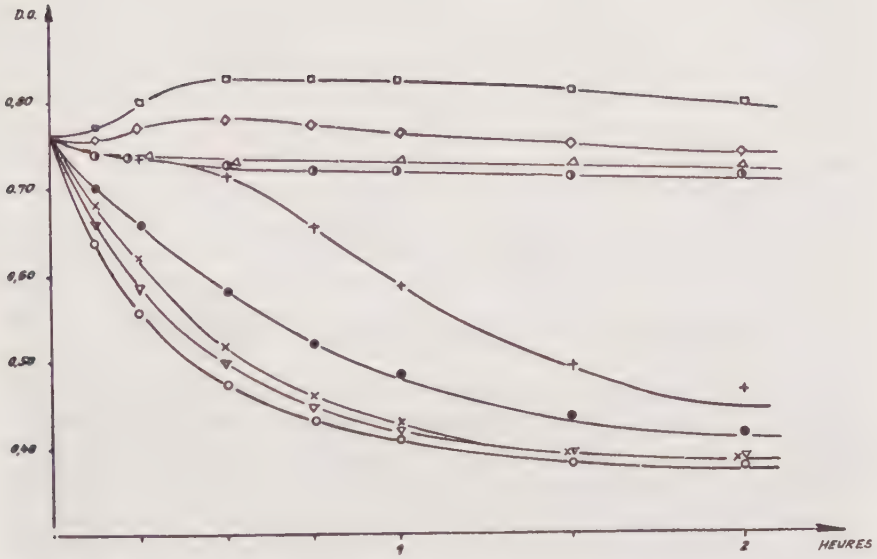

FIG. 4 - *Influence du sulfate de protamine sur l'activité lytique d'un sérum humain normal.*

○ = *sérum normal*
▽ = 1 *mg de protamine*
× = 0,5 *mg de protamine*
● = 2 *mg de protamine*
\+ = 5 *mg de protamine*
◑ = *sérum inactivé* + 0,5 *mg*
△ = *sérum inactivé* + 1 *mg*
◊ = *sérum inactivé* + 2 *mg*
□ = *sérum inactivé* + 5 *mg.*

Introduit à forte dose dans le système lytique, il entraîne une nette action retardatrice sur la lyse bactérienne, mais non pas d'inhibition. Les témoins effectués parallèlement à chaque série de mesure montrent que le sulfate de protamine n'a par lui-même aucune activité lytique vis-à-vis des bactéries d'épreuve.

Chapitre VIII

FRACTIONNEMENT DU SÉRUM

Le facteur bactériolytique présent dans les sérums normaux et désigné sous le nom d'obsistine par Colobert et Kirn ne paraît s'identifier à aucun facteur décrit jusqu'à ce jour. L'obsistine ne peut en effet s'identifier ni au complément dans son ensemble, ni au système complément-anticorps, ni au lysozyme, seul ou combiné à ces facteurs, ni à la properdine. Comme d'autre part, ainsi que nous venons de le montrer, l'obsistine et la lipoprotéine-lipase sont différents, nous avons entrepris de fractionner les sérums actifs du point de vue lytique, par l'application de procédés d'analyse classiques, indépendamment de toute hypothèse sur la nature du facteur en jeu.

Précipitation de deux fractions dont le mélange manifeste une activité lytique

La technique de précipitation des protéines par les sels neutres nous a permis d'obtenir deux fractions individuellement dépourvues d'activité lytique mais dont la réunion restaure l'activité lytique primitive. Nous avons utilisé pour ce fractionnement le mélange équimoléculaire de phosphate monopotassique et bipotassique, employé par Derrien et ses collaborateurs notamment pour le fractionnement du sérum sanguin et des diverses hémoglobines (30). Cette solution présente l'avantage d'assurer la constance du pH des divers mélanges expérimentaux et possède un grand pouvoir de relargage. On la prépare en dissolvant 272 g de phosphate monopotassique et 348,36 g de phosphate bipotassique dans de l'eau distillée chaude; on complète à 1 000 ml après refroidissement. Il faut conserver cette solution à 37° C afin d'éviter une cristallisation partielle des sels.

1) *Précipitation du sérum*

De nombreux essais préliminaires ont été nécessaires pour rechercher la concentration optimale en phosphate permettant un fractionnement

de l'activité lytique. Ces essais, menés en utilisant des concentrations croissantes de phosphate et en recherchant l'activité lytique dans les divers précipités pris isolément ou réunis, nous ont montré que le fractionnement peut être réalisé en amenant la concentration en phosphate du sérum à la valeur 1,5 M, puis dans un deuxième temps, en l'élevant à 2,5 M. Le mode opératoire auquel nous nous sommes arrêtés et que nous avons ensuite couramment utilisé est le suivant: à un volume exactement mesuré de sérum, on ajoute goutte à goutte à l'aide d'une burette, un volume de solution de phosphate mono- et bipotassique 4 M tel que la concentration finale en phosphate atteigne la valeur 1,5 M. Pour calculer la quantité de solution précipitante à ajouter, on considère que la quantité de phosphate du sérum au départ est nulle, la faible teneur du sang en phosphate et les petites variations de la phosphatémie étant négligeables par rapport aux concentrations employées. L'addition de la solution précipitante s'effectue à la température du laboratoire. On opère lentement en agitant modérément, une agitation trop forte entraînant une dénaturation des protéines et une perte de l'activité lytique. L'équilibre entre la phase liquide et la phase précipitée se fait rapidement. Après quatre heures d'attente à 4° C, on collecte le précipité par centrifugation à froid, trente minutes à 10 000 t/m. On décante soigneusement le surnageant et le précipité ainsi isolé constitue une première fraction sérique que nous appellerons F 1.

Le surnageant est amené à la concentration saline 2,5 M par addition à la burette d'une nouvelle quantité de solution de phosphate mono- et bipotassique 4 M. Cette addition se fait également à la température du laboratoire, en opérant lentement et en agitant le mélange modérément. Il se forme tout de suite un précipité important. Après quatre à six heures d'équilibrage à 4° C entre les deux phases, le précipité est collecté par centrifugation à froid, trente minutes à 10 000 t/m. La phase solide, bien ramassée, surnage sous forme d'un disque plus ou moins épais. On décante la phase liquide par aspiration à la trompe à vide et on récupère la phase solide qui constitue une deuxième fraction sérique que nous appellerons F 2.

Les deux précipités ainsi préparés se redissolvent facilement par simple addition d'eau distillée. On utilise pour cela la quantité minimum d'eau distillée nécessaire pour avoir une redissolution complète. On obtient ainsi deux solutions protéiques F 1 et F 2.

2) *Dialyse*

Les deux solutions protéiques dont nous venons d'indiquer la préparation, vont contenir des quantités importantes de phosphates mono- et bipotassiques dont il convient de se débarrasser. Pour réaliser cette opération, nous avons eu recours à la dialyse, cette technique étant celle qui

entraîne le moins de dénaturation des protéines. Les conditions de dialyse sont cependant différentes pour les deux fractions. La fraction F 2 est simplement dialysée contre de l'eau distillée. On opère en chambre froide, en changeant fréquemment l'eau de dialyse, jusqu'à ce que cette eau ne présente plus de réaction positive au réactif céruléo-molybdique de Denigès. Dans ces conditions, on observe dans le sac de dialyse un très léger précipité qu'on élimine par centrifugation. Nous avons vérifié que l'élimination de ce précipité n'influence en aucune façon l'activité lytique. Pour la fraction F 1, on ne peut pas effectuer de dialyse contre de l'eau distillée car on observe dans ce cas une perte quasi-totale de l'activité supportée par cette fraction, perte corrélative à la précipitation des euglobulines dans le sac de dialyse. Dans certaines expériences nous avons utilisé cette fraction simplement dissoute dans de l'eau distillée sans effectuer de dialyse. Mais la nécessité de diminuer la concentration en phosphates de la solution nous est bien vite apparue et nous a amené à effectuer une dialyse contre un tampon phosphate 0,066 M de pH 7,17, ou plus simplement contre une solution de chlorure de sodium 0,15 M. Les opérations de dialyse sont conduites comme précédemment en chambre froide et nous récupérons ainsi une solution protéique F 1 limpide et non dénaturée.

Après dialyse, on complète le volume de chacune des solutions à la moitié du volume initial de sérum, à l'aide d'eau distillée pour la solution F 2 et de tampon phosphate 0,066 M pour la solution F 1.

Activité lytique des deux fractions

1) *Conditions opératoires*

L'activité lytique du mélange des deux fractions sur une suspension d'*Eberthella typhosa* peut être qualitativement démontrée en utilisant une préparation contenant 0,5 ml de solution F 1 et 0,5 ml de solution F 2. Comme ces deux solutions sont chacune ramenées après dialyse à la moitié du volume initial de sérum, ces quantités sont proportionnelles à 1 ml de sérum.

Les mesures quantitatives d'activité lytique ont été effectuées selon la technique décrite pour le titrage de l'obsistine dans le sérum, en introduisant dans chaque tube réaction des quantités croissantes et équivalentes des fractions F 1 et F 2, soit 0,1 et 0,1, 0,2 et 0,2, 0,3 et 0,3 ml, etc... Les réactions se font toujours dans les conditions de normalisation du système lytique établies pour le titrage de l'obsistine dans le sérum. Après avoir introduit des quantités déterminées des deux fractions, on complète à un volume de 3 ml à l'aide de tampon phosphate 0,066 M de pH 7,17 et on ajoute 1 ml de suspension d'*Eberthella typhosa*. On note la chute de la densité optique au bout de trente minutes de bain-

marie à 37° C. On porte les résultats sur un graphique et on calcule le titre d'activité que l'on exprime en unités d'obsistine.

2) *Mesure de l'activité lytique*

Aucune activité ne peut être décelée quand on utilise les deux fractions isolément, quelles que soient les quantités de l'une ou de l'autre que l'on introduit dans la réaction. Par contre en réunissant les deux fractions F 1 et F 2 on restaure l'activité lytique. Il est remarquable de constater que cette activité est, dans la majorité des cas, supérieure à celle du sérum complet initial. La figure 5 donne le résultat d'un titrage de l'activité lytique effectué sur un sérum et sur le mélange des deux fractions F 1 et F 2 préparées à partir de ce même sérum. On voit que ce dernier possède un titre de 6,8 unités alors que le mélange des deux fractions F 1 et F 2 présente un titre de 7,7 unités.

Pour déterminer le rapport d'activité spécifique (unité d'obsistine / quantité de protéine) nous avons effectué un dosage photométrique des

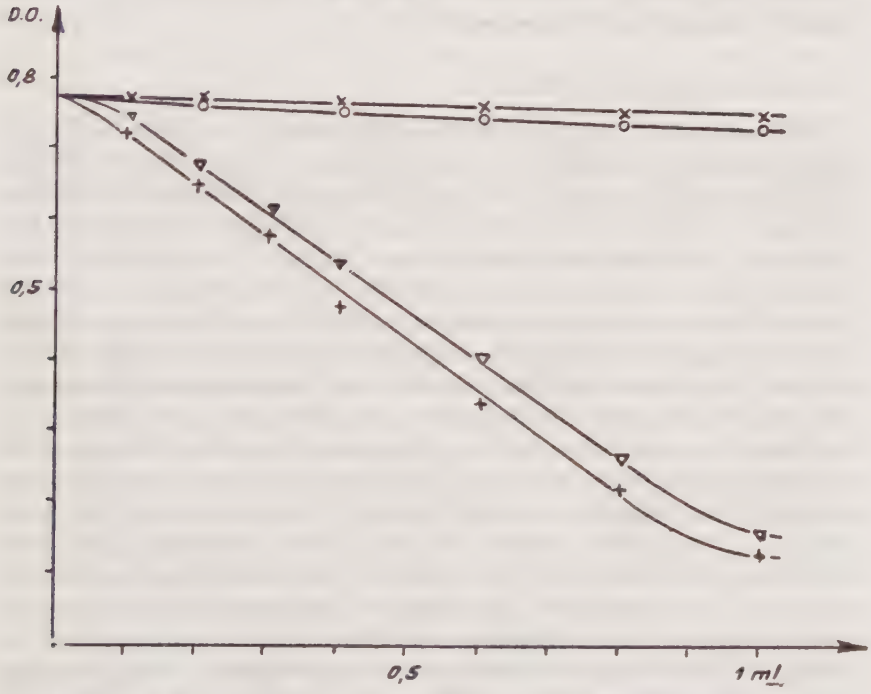

FIG. 5 - *Titrage de l'activité lytique des deux fractions sériques isolées.*
○ = *fraction F 1 seule*
× = *fraction F 2 seule*
\+ = *mélange en quantité égale des deux fractions F 1 et F 2* (7,7 *U. obsistine*)
▽ = *sérum de départ* (6,8 *U. obsistine*).

protéines au biuret selon Riegler (91). L'addition à une solution de protéine de sulfate de cuivre et de soude produit une coloration violette stable, dont, dans des conditions déterminées, l'intensité est proportionnelle à la concentration en protéines. Parmi les nombreuses techniques proposées, nous avons eu recours à la technique de Gornall (45). 1 ml de solution protéique diluée au vingtième est additionné de 4 ml de réactif cuprotartrique de Gornall. Après trente minutes, on mesure l'intensité de la coloration développée au photomètre et on se rapporte à une gamme d'étalonnage établie dans les mêmes conditions opératoires à l'aide d'une solution protéique de titre connu. On note ainsi que dans le sérum complet, nous avons une quantité de 74 mg de protéines par ml, alors que la fraction F 1 en contient 38 mg par ml et la fraction F 2 50 mg par ml (ces deux fractions étant concentrées d'une fois par rapport au sérum complet de départ). Le rapport d'activité spécifique a une valeur de 0,092 pour le sérum et de 0,175 pour le mélange des deux fractions. Le rapport d'activité spécifique augmentant quand la purification progresse, on voit que le fractionnement du sérum a déjà entraîné une purification prononcée.

Influence des ions phosphates

Nous avons déjà indiqué que le comportement à la dialyse des solutions protéiniques obtenues par redissolution des deux précipités F 1 et F 2 n'était pas identique. Si l'on peut effectuer la dialyse de la fraction F 2 contre de l'eau distillée sans pratiquer d'altération, la fraction F 1 par contre, perd dans ces conditions toute activité. C'est pourquoi dans notre travail, au cours de la recherche de l'activité lytique du mélange des deux fractions, nous avons été amenés à effectuer des essais à l'aide d'une fraction F 1 simplement redissoute dans de l'eau distillée et non dialysée. En utilisant une telle solution, nous nous sommes aperçus que l'on pouvait noter une activité lytique du mélange des deux fractions à condition de supprimer le tampon phosphate du système lytique et de le remplacer par de l'eau distillée. En effet, en plaçant dans des tubes à hémolyse des quantités égales de fractions F 1 non dialysées et de fraction F 2, en complétant ensuite à 3 ml à l'aide de tampon phosphate 0,066 M et en ajoutant 1 ml de suspension d'*Eberthella typhosa*, la lyse des bactéries est très faible. Par contre, si l'on complète le volume des deux fractions à 3 ml à l'aide d'eau distillée et que l'on ajoute 1 ml de suspension bactérienne, on observe une lyse identique à celle du sérum initial. Cela suggère un rôle inhibiteur des phosphates lorsqu'ils atteignent une concentration suffisante. Nous avons dosé les phosphates présents dans les deux systèmes lytiques par la méthode classique de Briggs (13). Le principe en est le suivant: lorsqu'à une solution contenant des ions orthophosphoriques on ajoute un excès de molybdate et un

réducteur, il se produit un complexe phospho-molybdeux-molybdique de coloration bleue intense et qui se prête à un dosage colorimétrique. Les protéines du milieu réactionnel sont préalablement éliminées par l'acide trichloracétique et on compare la coloration obtenue à une gamme étalon de phosphates. On note ainsi que dans le premier cas, lorsque l'on associe la fraction F 1 non dialysée à une fraction F 2, en présence de tampon phosphate, la quantité de phosphates dans le milieu réactionnel est de 9,60 mg (exprimé en phosphore). Dans le deuxième cas, lorsque le tampon phosphate est remplacé par de l'eau distillée, cette quantité n'est plus que de 5,40 mg.

Afin de préciser l'influence des ions phosphates sur l'intensité de la lyse bactérienne, nous avons entrepris une étude systématique. Les essais ont été menés en utilisant un mélange des deux fractions F 1 et F 2 et des solutions tampons phosphates de molarité croissante. Pour chaque molarité utilisée, nous avons effectué un titrage de l'activité lytique des deux fractions sur la suspension d'*Eberthella typhosa* dans les conditions suivantes: 0,1, 0,2, 0,3, 0,5 et 1 ml du mélange des deux fractions sont introduits dans six tubes à hémolyse. On complète à un volume de 3 ml à l'aide de tampon phosphate de molarité déterminée et on ajoute 1 ml de suspension bactérienne. On note la chute de la densité optique de cette suspension après trente minutes de bain-marie à 37° C pour tous les tubes et on calcule le titre apparent d'activité lytique. En portant sur un graphique les divers titres calculés en fonction de la molarité du tampon introduit dans la réaction, on obtient une courbe en cloche, représentée dans la figure 6.

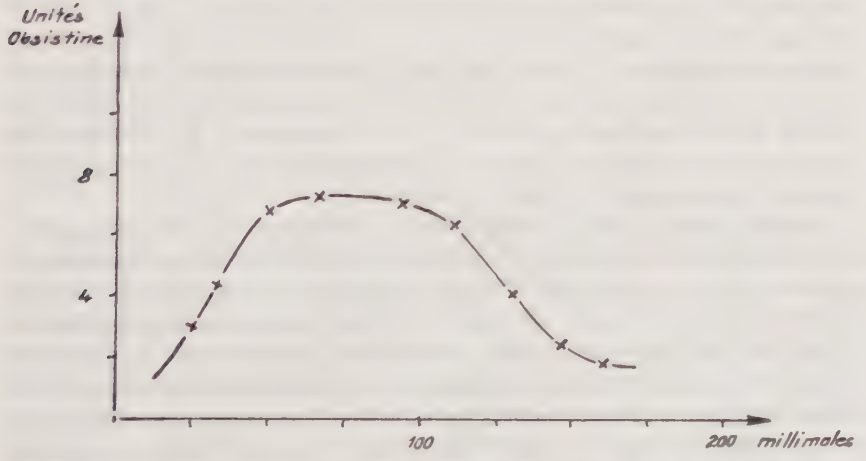

Fig. 6 - *Influence de la quantité de phosphates sur l'intensité de l'activité lytique exprimée en unités d'obsistine.*

On voit qu'il existe un optimum de concentration en phosphate qui se situe entre 50 et 100 millimoles. Au-delà et en deçà de ces valeurs, on assiste à une chute importante de l'activité lytique. Ces observations nous ont amené à rechercher un moyen d'ajuster dans la fraction F 1, la concentration des phosphates provenant de la précipitation fractionnée du sérum. Comme nous l'avons déjà indiqué, on y parvient en effectuant une dialyse contre une solution tampon phosphate 0,066 M de pH 7,17. Mais on peut éliminer tous les phosphates sans altération de la fraction F 1 en dialysant contre une solution de chlorure de sodium 0,15 M. Colobert et Kirn (23) avaient déjà signalé l'influence de la concentration en phosphates sur l'activité lytique des sérums normaux. Ils ont indiqué que l'activité s'accroît en même temps que la concentration en phosphates, mais de manière faible pour des concentrations supérieures à 0,03 M. Nous retrouvons cette même particularité lorsque l'on étudie l'influence des phosphates sur l'activité du mélange des deux fractions isolées à partir du sérum, en notant toutefois que pour des valeurs supérieures à 0,1 M, l'activité lytique est fortement inhibée.

Influence de la quantité relative des deux fractions

Dans les expériences que nous avons décrites jusqu'ici, nous avons arbitrairement choisi, pour mettre en évidence l'activité lytique, de mélanger en quantité égale les fractions F 1 et F 2. Il restait cependant à voir s'il n'existait pas une proportion relative optimale entre ces deux fractions, capable d'assurer une lyse maximale de la suspension bactérienne. Afin d'étudier ceci, nous avons réalisé une série d'essais en introduisant dans des tubes à hémolyse une quantité fixe de la première fraction (dialysée contre une solution de chlorure de sodium 0,15 M) et en augmentant la quantité de la seconde fraction introduite d'un tube à l'autre. On complète à 3 ml à l'aide de la solution tampon phosphatée et on ajoute 1 ml de suspension d'*Eberthella typhosa* à tous les tubes. On note la densité optique présentée par la suspension des divers tubes après un séjour de trente minutes au bain-marie à 37° C. Les résultats de ces essais sont rapportés dans le tableau 1.

Pour les valeurs de F 2 inférieures à 0,5 ml, on s'aperçoit que, quelles que soient des quantités de F 1 introduites, l'activité lytique reste extrêmement faible. Par contre, l'activité lytique s'accroît quand, pour un volume fixe de la fraction F 2 égal à 0,5 ml, on augmente le volume de la fraction F 1 jusqu'à 0,5 ml. Au-delà de cette valeur, les quantités introduites dans le système lytique n'accentuent plus la chute de la densité optique de la suspension bactérienne. Par contre pour la fraction F 2, on note que plus la quantité introduite dans la réaction est grande, plus la lyse est intense. Il y a proportionnalité entre la quantité de F 2 et l'intensité de la lyse, à condition que la fraction F 1 soit présente en

		F 1				
		0,2 ml	0,4 ml	0,5 ml	0,6 ml	0,8 ml
F 2	0,2 ml	0,73	0,71	0,69	0,69	0,69
	0,4 ml	0,60	0,57	0,51	0,51	0,51
	0,5 ml	0,51	0,46	0,45	0,46	0,45
	0,6 ml	0,47	0,41	0,40	0,40	0,40
	0,8 ml	0,45	0,36	0,33	0,33	0,35
	1 ml	0,46	0,29	0,28	0,26	0,30

TABLEAU 1 - *Densités optiques des suspensions bactériennes au bout de trente minutes à 37° C, en fonction des quantités de fractions F 1 et F 2 introduites dans chaque réaction. Densité optique des suspensions bactériennes au départ: 0,78.*

quantité optimale. Il existe donc bien une proportionnalité optimum entre les deux fractions qui dans nos conditions expérimentales est de 0,5 ml de fraction F 1 et de 1 ml de fraction F 2.

Electrophorèse des fractions F 1 et F 2

Nous avons soumis les deux fractions F 1 et F 2 à une électrophorèse sur papier dans les conditions opératoires suivantes: papier Whatman n° 1, tampon véronal de force ionique 0,01 de pH 8,2, durée de la migration trois heures, sous un voltage de 250 volts. La révélation des protéines a été réalisée par le vert lumière.

Dans ces conditions, la fraction F 1 se comporte comme des gamma globulines contenant une faible quantité d'albumine, la fraction F 2 contient en majeure partie des albumines et quelques globulines alpha et bêta.

Stabilité des deux fractions

a) *Action de la température.* Les fractions F 1 et F 2 sont toutes deux thermolabiles. Un chauffage de l'une ou de l'autre dix minutes à 56° C entraîne une disparition complète de l'activité.

b) *Vieillissement à la température ordinaire.* Les deux fractions provenant du fractionnement du sérum et présentant une activité bactériolytique par leur mélange, ne sont plus capables de provoquer de lyse bactérienne après un séjour de vingt-quatre heures à la température du laboratoire. Nous avons recherché si l'altération portait sur les deux fractions à la fois et nous avons constaté une évolution différente en fonction du temps. La fraction F 1 ne subit pas de diminution sensible

d'activité durant les premières vingt-quatre heures. Ensuite on assiste à une chute d'activité et après quarante-huit heures, elle est devenue complètement inactive. La fraction F 2 est beaucoup plus sensible. Un simple séjour de cinq à six heures à la température ordinaire entraîne une perte importante et parfois totale de son activité.

c) *Conservation à 4° C.* Les deux fractions placées à 4° C conservent leur activité pendant environ une semaine. Un titrage d'activité effectué sur leur mélange au moment de leur préparation et après six jours de chambre froide, ne montre pas de chute notable du pouvoir bactériolytique sur *Eberthella typhosa.* En étudiant séparément le comportement des deux fractions, on note que la pemière fraction conserve toute son activité après un séjour de plusieurs mois en chambre froide. Nous avons ainsi utilisé des solutions conservées plus de quatre mois à 4° C qui associées à une fraction F 2 fraîchement préparée, ne montrent pas la moindre diminution d'activité lytique. Avec certaines préparations on voit apparaître au bout de quinze jours à trois semaines un léger trouble au sein de la solution. Ce trouble s'élimine facilement par centrifugation, sans que l'activité de la fraction en soit affectée. La fraction F 2 par contre accuse une nette chute d'activité après un séjour de cinq à six jours à la glacière. Un titrage d'activité fait comparativement après sa préparation et après ce délai, en présence d'une fraction F 1 non altérée, nous a montré qu'il ne subsiste que quarante pour cent de l'activité initiale. Dans certains cas extrêmes, la fraction F 2 était déjà inactive trois jours après sa préparation.

d) *Comportement à la lyophilisation.* Lorsque l'on lyophilise un sérum à forte teneur en obsistine, on ne retrouve plus d'activité lytique après remise en solution du culot desséché. Nous avons étudié le comportement de chacune des deux fractions après lyophilisation. On note ainsi que la fraction F 2 supporte très bien celle-ci. Après redissolution du culot et en présence de la fraction F 1, on retrouve intégralement l'activité initiale. En revanche, la fraction F 1 perd dans ces conditions toute son activité. Associée à la fraction F 2 récemment préparée et non altérée, la fraction F 1 après lyophilisation n'est plus capable de provoquer la lyse des bactéries d'épreuve.

Le fait que le sérum normal perd son activité lytique par lyophilisation est donc selon ces expériences à rapporter à une dénaturation de la fraction F 1. Il est intéressant de noter que la première fraction se conserve facilement à 4° C mais qu'elle est dénaturée par la lyophilisation, alors que pour la deuxième fraction nous observons un phénomène inverse. Très altérable même à 4° C, elle conserve son activité après lyophilisation.

Chapitre IX

PURIFICATION DE LA PREMIÈRE FRACTION DU SÉRUM

Afin d'obtenir une purification plus poussée de la première fraction du sérum, nous avons tenté de la refractionner en utilisant le relargage par les sels. Nous avons eu recours pour réaliser ce fractionnement à une solution de phosphates et à une solution de sulfate d'ammonium.

Précipitation fractionnée par les phosphates

Le précipité obtenu à partir du sérum à la concentration en phosphates 1,5 M se redissout parfaitement dans l'eau distillée et dans diverses solutions salines. Comme nous l'avons déjà indiqué, une dialyse contre l'eau distillée fait apparaître un précipité abondant en même temps que le pouvoir lytique disparaît. Pour obtenir des solutions protéiques de concentration saline définie, nous avons effectué la redissolution du précipité dans une solution tampon phosphate 0,066 M de pH 7,2, puis une dialyse contre ce même tampon. Dans ces conditions il n'apparaît pas de précipité dans le sac de dialyse, la fraction F 1 du sérum ne présente pas de dénaturation et conserve toute son activité.

A partir de cette solution, nous avons cherché à avancer la purification par des précipitations successives aux concentrations 1,14 M, 1,44 M, 1,72 M, et 2,05 M à l'aide de la solution équimoléculaire de phosphates mono- et bipotassique 4 M. Nous obtenons ainsi une série de précipités que nous désignerons par les symboles P 1 - P 2 - P 3 - P 4 selon leur ordre d'obtention. La technique est la suivante: à 20 ml de solution protéinique, on ajoute en agitant modérément 8 ml de solution précipitante. Après une heure d'attente à 4° C, on centrifuge. Le culot est redissout dans le minimum possible de tampon phosphate 0,066 M et mis à dialyser contre ce même tampon. Une fois la dialyse terminée, on rétablit le volume de la solution au volume de départ, soit 20 ml, à l'aide de tampon phosphate. On obtient ainsi une première fraction P 1 formée par le précipité protéinique obtenu à 1,14 M. Les 25 ml de sur-

nageant sont additionnés de 3 ml de solution précipitante 4 M. On effectue les mêmes opérations que précédemment. Le culot de centrifugation redissout, dialysé, complété à 20 ml, constitue la deuxième fraction P 2, correspondant aux protéines précipitant entre les concentrations en phosphates 1,14 M et 1,44 M. Le surnageant, 24 ml, est à nouveau additionné de 3 ml de solution précipitante et le précipité formé nous amène selon le même mode opératoire à une troisième fraction P 3 qui représente les protéines précipitant entre 1,44 M et 1,72 M. Le surnageant additionné de 4 ml de solution précipitante ne fournit qu'un très léger précipité. Celui-ci remis en solution, nous donne une quatrième fraction P 4 représentant les protéines précipitant entre 1,72 M et 2,05 M.

Pour la recherche et la mise en évidence de l'activité de l'une de ces sous-fractions, nous avons placé chaque fraction en présence d'un volume constant de la deuxième fraction sérique F 2. On opère toujours dans les conditions normalisées, en complétant le volume à 3 ml à l'aide de tampon phosphate et en ajoutant 1 ml de suspension d'*Eberthella typhosa*. On mesure la densité optique de la suspension après vingt, trente et soixante minutes de bain-marie à 37° C. On note ainsi que les deux premières fractions P 1 et P 2 manifestent chacune une légère activité. En reprenant ces expériences et en opérant cette fois-ci sur un mélange des sous-fractions, on se rend compte que la réunion des deux fractions P 1 et P 2 entraîne une activité beaucoup plus prononcée que celle observée à l'aide des fractions prises isolément. Cette activité n'est pas influencée par les deux autres sous-fractions, mais elle reste cependant plus faible que celle du sérum avant tout fractionnement. Un titrage effectué à l'aide du mélange des deux sous-fractions P 1 et P 2, en présence d'une quantité fixe de fraction F 2, nous montre que la perte d'activité par rapport au sérum de départ, atteint environ cinquante pour cent.

Précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium

Nous avons également utilisé une solution de sulfate d'ammonium pour fractionner F 1. Le précipité F 1 obtenu comme précédemment à la concentration 1,5 M en phosphates, est redissout non plus dans une solution tampon phosphatée mais à l'aide d'une solution de chlorure de sodium 0,15 M. On dialyse contre cette même solution jusqu'à disparition des ions phosphates dans les eaux de dialyse. La solution de sulfate d'ammonium employée est à la concentration 3,5 M et le pH est amené aux environs de 7,2 à l'aide d'une solution diluée d'ammoniaque. La fraction F 1 a été scindée en trois parties en portant la concentration en sulfate d'ammonium d'abord à 1,4 M puis à 1,65 M et enfin à 2 M. Le mode opératoire suivi pour ce fractionnement est le suivant: on part de 10 ml de solution protéique auxquels on ajoute 6,67 ml de sulfate

d'ammonium 3,5 M. Après deux heures d'attente à 4° C, on centrifuge et on isole un premier précipité. Le surnageant, soit 14,8 ml, est additionné de 2,20 ml de solution précipitante et l'on obtient un second précipité contenant les protéines précipitant entre 1,40 et 1,66 M. Le surnageant, soit 14,5 ml, est additionné de 2,5 ml de sulfate d'ammonium. On récolte un troisième précipité correspondant aux protéines précipitant entre 1,66 M et 2 M. Tous ces précipités sont redissout dans le minimum de solution de chlorure de sodium 0,15 M et dialysés contre cette même solution jusqu'à ce que l'eau de dialyse ne donne plus de réaction positive avec le réactif de Nessler. On complète alors ces trois solutions au volume primitif, soit 10 ml et l'on a ainsi trois sous-fractions de F 1 que nous désignerons par les lettres A B et C selon leur ordre d'obtention.

Nous avons d'abord recherché l'activité de chacune de ces sous-fractions, ensuite nous avons utilisé un mélange des trois et un mélange deux à deux de ces sous-fractions. Les essais ont été opérés en présence d'une quantité fixe, égale à 1 ml, de fraction F 2 fraîchement préparée et dont l'activité a été éprouvée par ailleurs. On peut ainsi se rendre compte que les deux premières sous-fractions A et B prises isolément, manifestent une très légère activité en présence de la fraction F 2, alors que la fraction C ne possède aucune activité. Dans les essais ultérieurs, en associant ces diverses sous-fractions, nous avons observé que le mélange des deux premières détermine une lyse bactérienne bien supérieure à celle obtenue à l'aide des fractions prises isolément. On peut donc supposer que l'activité liée à la fraction F 1 du sérum peut être scindée en deux parties se retrouvant dans les sous-fractions A et B après re-fractionnement à l'aide de sulfate d'ammonium. Mais pour cela, il faut éliminer l'hypothèse qu'il puisse s'agir d'un même composé présent dans les deux sous-fractions. Nous avons pu nous rendre compte qu'il n'en était rien en effectuant des essais à l'aide de volumes de sous-fractions A et B double ou triple. Chacun de ces échantillons pris isolément est incapable de provoquer une lyse comparable à celle observée à l'aide de l'association des fractions A et B.

Les essais de purification et de fractionnement de F 1 réalisés avec de nombreux lots de sérums ont permis de retrouver qualitativement tous les résultats décrits, mais non pas toujours quantitativement.

Critère de pureté

Afin de nous rendre compte du degré d'homogénéité des deux premières sous-fractions, nous les avons soumises à une électrophorèse sur papier dans les conditions opératoires suivantes: papier Whatman n° 1, voltage 250 volts pour une durée de migration de trois heures, tampon véronal sodique de force ionique 0,01, de pH 8,2, la révélation étant

faite par le vert lumière. Dans ces conditions, on observe pour la sous-fraction A une seule bande électrophorétique se situant au niveau des gamma globulines et pour la sous-fraction B, une bande importante au niveau des gamma globulines et une autre de faible importance au niveau des albumines.

La sous-fraction A paraissant électrophorétiquement homogène, nous avons voulu déterminer avec plus de précision son degré d'homogénéité en établissant une courbe de solubilité à force ionique variable. La méthode est basée sur le fait que la solubilité d'une protéine dans une solution saline dépend de quatre facteurs: la concentration saline, le pH, la concentration en protéines et la température. Il est possible de réaliser l'analyse d'un mélange de protéines en maintenant constants trois de ces facteurs et en faisant varier le quatrième. Le procédé d'analyse consistant à prendre la concentration saline comme variable, se montre particulièrement adapté à l'étude d'un mélange complexe de protéines (31 - 32). C'est à lui que nous avons fait appel pour vérifier le degré d'homogénéité de la fraction A obtenue lors de la purification. Le mode opératoire consiste à introduire dans une série de tubes à centrifuger, contenant un volume constant de solution protéique à analyser, des volumes croissants de 0,1 en 0,1 ml de solution saline. On complète à un volume fixe à l'aide d'eau distillée. Les tubes sont maintenus à température constante et lorsque l'équilibre entre la phase dissoute et la phase précipitée est réalisé, on élimine cette dernière par centrifugation. On détermine ensuite la quantité de protéines restées en solution.

Pour une protéine pure, la représentation graphique de la variation de la quantité de protéines restée en solution en fonction de la concentration saline, est une exponentielle. Pour un mélange de protéines, la courbe représentative est formée par une succession de fractions d'exponentielles séparées par des points anguleux dont chacun traduit la formation d'une nouvelle phase solide de solubilité particulière. Dans la pratique, il est souvent difficile d'interpréter ces figures. Par contre, en traçant la courbe en coordonnées semi-logarithmiques, les portions d'exponentielles comprises entre deux points anguleux et correspondant chacune à la précipitation d'une phase définie, sont transformées en segments de droites différant par leur pente. Dans ces conditions, la représentation graphique peut être établie avec sécurité à partir de données expérimentales de précision relativement faible.

Nous avons utilisé cette méthode selon la technique suivante: dans 20 tubes à centrifuger, on introduit un volume constant de 0,5 ml de sous-fraction A à analyser. Puis on ajoute des volumes croissants de 0,1 en 0,1 ml de solution de sulfate d'ammonium 3,5 M. La quantité de sulfate d'ammonium varie dans ces conditions de 0,058 M d'un tube à

l'autre. On complète alors à un volume fixe de 6 ml à l'aide d'eau distillée ajoutée à la burette de précision. Les tubes sont bouchés, agités et maintenus dans un bain de glace fondante durant une nuit. Après ce temps, l'équilibre entre la phase dissoute et la phase précipitée se trouvant réalisé, on élimine cette dernière par centrifugation à 0° C, vingt minutes, à 10 000 tours/minute. On décante soigneusement le surnageant et on mesure la quantité de protéines restées en solution par absorption dans l'ultraviolet à 280 mμ. On trace une courbe en coordonnées semi-logarithmiques, en portant en abscisses la concentration en sulfate d'ammonium et en ordonnées la quantité de protéines présentes dans le surnageant. La figure 7 montre la courbe de solubilité que l'on observe avec la sous-fraction A. On voit que la sous-fraction A, bien qu'homo-

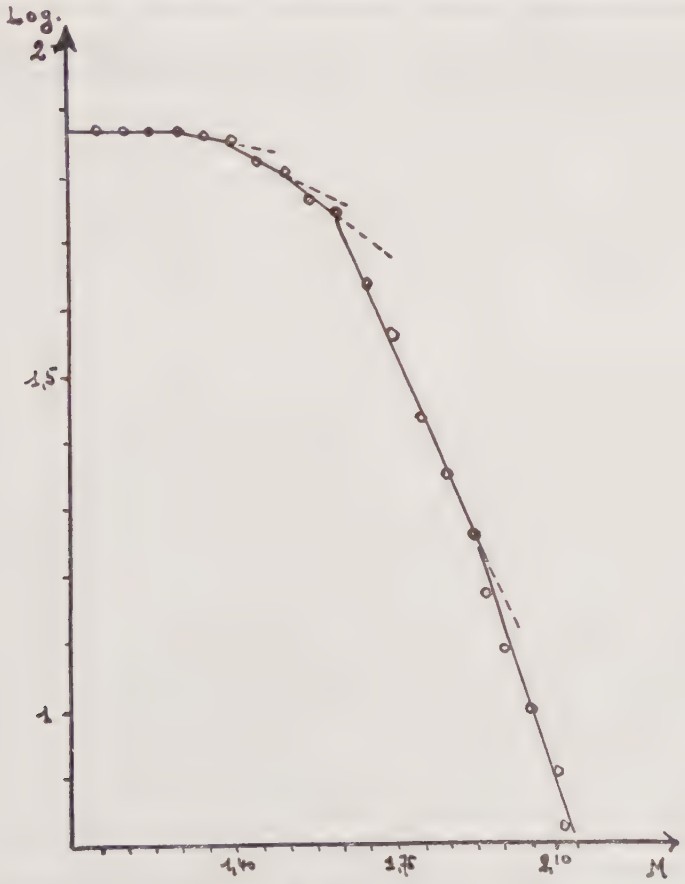

FIG. 7 - *Précipitation de la fraction A à force ionique variable.*
En abscisses, la concentration en moles du sulfate d'ammonium.
En ordonnées, les logarithmes de la densité optique des surnageants à 280 mμ.

gène à l'électrophorèse sur papier, est en fait encore constituée d'au moins cinq protéines différentes.

Nous avons tenté d'isoler les cinq composants mis en évidence, en utilisant les données fournies par les courbes de relargage. Après avoir précipité le premier composant, on cherche par addition d'une nouvelle quantité de sulfate d'ammonium, à précipiter le second. Ces essais se sont soldés par des échecs du fait de la trop faible concentration en protéines.

Il résulte de cet ensemble de données que l'activité de la fraction F 1 du sérum n'est pas l'apanage d'une protéine unique, comme on pouvait le supposer a priori, mais de deux au minimum. Il est en effet possible de scinder F 1 à l'aide de phosphates ou mieux de sulfate d'ammonium en deux sous-fractions, dont chacune prise isolément est très peu active mais dont la réunion restaure une grande partie de l'activité initiale. Les opérations de fractionnement entraînent cependant toujours une perte d'activité, probablement par dénaturation partielle des protéines responsables de cette activité.

Chapitre X

PURIFICATION DE LA DEUXIÈME FRACTION DU SÉRUM

De même que nous l'avons fait pour F 1, nous avons cherché à purifier et à isoler le principe responsable de l'activité de F 2. La parfaite solubilité de cette fraction dans l'eau distillée et la possibilité d'effectuer une dialyse contre de l'eau distillée sans perte d'activité, permet l'utilisation de méthodes chromatographiques par adsorption réversible sur résine échangeuse d'ions. Nous avons ainsi été amené à utiliser une résine synthétique carboxylique, l'Amberlite XE-64 et une cellulose échangeuse d'ions, la diéthylaminoéthylcellulose.

Chromatographie sur Amberlite XE-64

La confection des colonnes d'Amberlite XE-64 a été réalisée en plaçant environ vingt grammes de résine mise en suspension dans de l'eau distillée, dans une colonne de 25 mm de diamètre et de 250 mm de hauteur. On laisse la résine sédimenter sur une hauteur de 170 mm en ajoutant de l'eau distillée et en prenant soin que le niveau de l'eau soit constamment au-dessus de la résine. On équilibre ensuite soigneusement la résine à l'aide de tampon phosphate mono- et bipotassique 0,2 M de pH 6,69, le pH de la solution effluente devant être exactement le même que celui du tampon introduit. Lorsque cette condition est réalisée, la colonne est prête à recevoir la solution protéique à chromatographier. Cette dernière est elle-même équilibrée par dialyse contre le même tampon. La colonne est chargée avec une quantité déterminée de solution, 5 ou 10 ml selon les expériences, et on laisse le tampon perfuser à la vitesse d'environ 20 ml par heure. On recueille des volumes de 5 ml à l'aide d'un collecteur de fractions. L'élution des protéines est suivie par la mesure de l'absorption que présentent les contenus des divers tubes du collecteur dans l'ultraviolet à la longueur d'onde de 280 mμ. Après chaque chromatogramme la résine est régénérée par passage d'acide

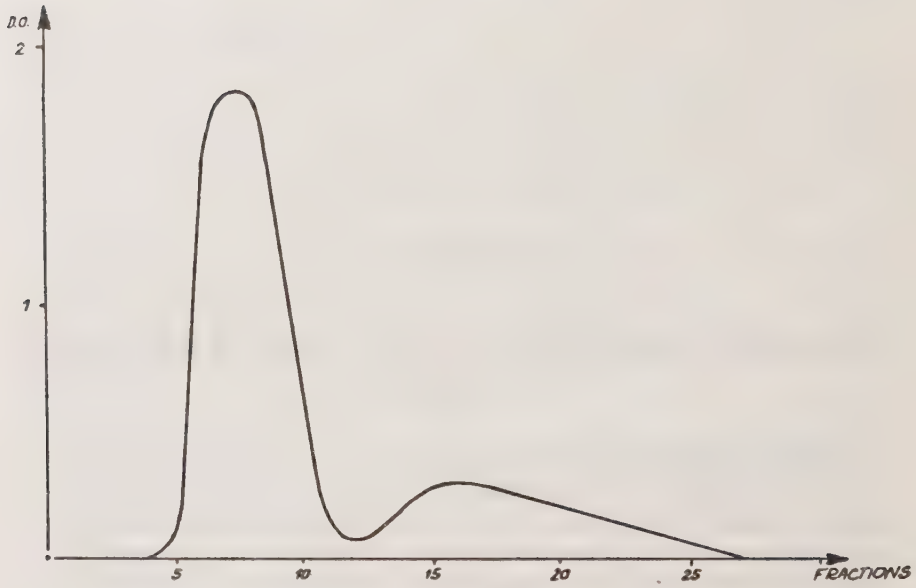

FIG. 8 - *Chromatographie de la Fraction F 2 du sérum sur Amberlite XE-64.*
En abscisses, les fractions de 5 ml éluées.
En ordonnées, la densité optique des fractions à 280 mμ.

chlorhydrique N et perfusée à l'aide d'eau distillée jusqu'à disparition des ions chlore dans les liquides effluents.

On établit un diagramme d'élution des protéines en portant en abscisses les volumes de solution effluente recueillie et en ordonnées la quantité de protéines éluées. La figure 8 représente le diagramme d'élution que l'on observe dans ces conditions avec la fraction F 2 du sérum. Le pourcentage des protéines éluées après passage de 250 ml de solution tampon est de 99,2 pour cent.

On voit que la chromatographie de F 2 sur Amberlite XE-64 nous fournit deux pics protéiques, l'un très important représentant 80 pour cent des protéines éluées, l'autre bien moindre et beaucoup plus étiré, représentant 20 pour cent des protéines. Pour rechercher l'activité de ces deux fractions, nous avons d'abord éliminé les ions phosphates provenant de la chromatographie. Pour cela, on réunit le contenu des tubes correspondant à chacun des deux pics et les deux lots sont mis à dialyser contre de l'eau distillée.

Les procédés de fractionnement par chromatographie offrent l'inconvénient de diluer les solutions protéiques au point qu'il n'est plus possible de vérifier leur activité. Tous les essais tentés avec les solutions chromatographiées et dialysées ont toujours été négatifs. Il nous fallait

donc avoir recours à un procédé de concentration des solutions à étudier. Nous avons utilisé la dialyse contre une solution concentrée de polyvinylpyrrolidone (Subtosan de Rhône-Poulenc). Ce polymère de synthèse possède un poids moléculaire moyen de 40 000, il est très soluble dans l'eau mais il ne dialyse pas au travers des membranes de cellophane. La concentration des solutions protéiques se fait ainsi facilement par dialyse à travers une membrane de cellophane. Deux procédés peuvent être employés pour réaliser cette concentration, soit saupoudrer le sac de dialyse à l'aide du produit, soit utiliser une solution concentrée ou la solution commerciale à 25%. C'est cette dernière méthode que nous avons employée, en opérant en chambre froide à 4° C. On surveille la concentration des solutions et on arrête la dialyse lorsque le volume de la solution à l'intérieur du sac de dialyse est inférieur au volume de la solution F 2 utilisée pour la chromatographie. Le contenu des sacs de dialyse est récupéré et ajusté au volume de la solution avant chromatographie, à l'aide d'eau distillée. On recherche alors l'activité de ces solutions concentrées.

L'épreuve d'activité est conduite en opérant en présence d'un volume fixe de la fraction F 1 du sérum (0,5 ml), auquel on ajoute des volumes variables des deux constituants chromatographiques. On complète à un volume de 3 ml à l'aide de tampon phosphate 0,066 M et tous les tubes sont additionnés de 1 ml de suspension bactérienne. On suit la chute de la densité optique après un séjour de trente et de soixante minutes au bain-marie à 37° C. On note dans ces conditions une activité liée au premier pic chromatographique. Le second ne présente aucune activité et son addition au premier composant n'entraîne aucune variation de la lyse bactérienne.

La chromatographie sur Amberlite XE-64 n'amène, comme nous le voyons, qu'une faible séparation protéique et l'activité de la fraction F 2 se retrouve dans le premier composant chromatographique, contenant la plus grande partie des protéines chromatographiées. L'utilisation de cette résine a donné de remarquables résultats dans la séparation de protéines basiques ou neutres, mais elle ne se prête pas à l'étude des protéines les plus répandues dont le pH isoélectrique se situe dans la zone acide. C'est pour cette raison que nous avons eu recours à une cellulose échangeuse d'ions permettant la séparation des protéines courantes.

Chromatographie sur diéthylaminoéthylcellulose

Pour effectuer les chromatographies sur diéthylaminoéthylcellulose, on réalise des colonnes en introduisant une suspension de 25 grammes de cellulose dans de l'eau distillée, dans des colonnes de 32 mm de diamètre intérieur et de 250 mm de hauteur, placées sur des fioles à vide. On

laisse la cellulose sédimenter sur une hauteur de 180 mm et on aide au tassement en effectuant une légère aspiration à l'aide d'une trompe à vide. La colonne est ensuite équilibrée avec un tampon phosphate monopotassique-disodique 0,02 M de pH 6,65. La solution F 2 à chromatographier, également équilibrée contre ce même tampon, est introduite au sommet de la colonne. On procède à l'élution en effectuant une perfusion de la colonne d'abord par le tampon, puis par le tampon contenant du chlorure de sodium aux concentrations de 0,05, 0,15 et 0,5 moles par litre. L'écoulement à travers la colonne est réglé à la vitesse de 1 ml par minute. Les liquides d'élution sont recueillis par fraction de 10 ml à l'aide d'un collecteur de fractions et la quantité de protéines contenues dans ces fractions est déterminée par la mesure de l'absorption dans

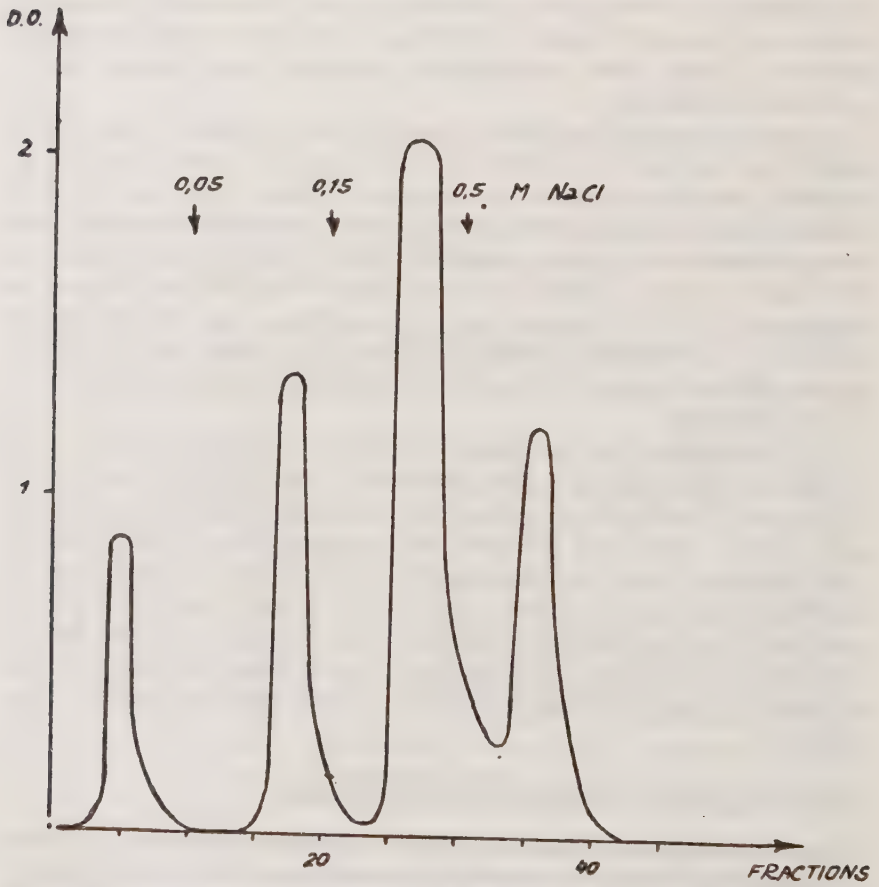

Fig. 9 - *Chromatographie de la fraction F 2 du sérum sur diéthylaminoéthylcellulose. En abscisses, les fractions de 10 ml recueillies. En ordonnées, la densité optique des fractions à* 280 mμ.

l'ultraviolet à 280 mμ. Les colonnes sont régénérées après chaque chromatogramme en effectuant une suite de lavages par une solution de soude 0,5 N, de l'eau distillée, de l'acide chlorhydrique N et un lavage final à l'eau bidistillée jusqu'à disparition des ions chlore dans les eaux de lavage.

En traçant la courbe représentative des protéines éluées en fonction du volume du liquide effluent pour une chromatographie de la fraction F 2 du sérum, on observe quatre pics, correspondant aux quatre molarités du liquide d'élution. Le pourcentage de protéines récupérées variait selon les expériences entre 92,3 et 95 pour cent. On réunit le contenu des tubes correspondants à chaque pic et les quatre lots constitués sont mis à dialyser contre de l'eau distillée et sont ensuite concentrés par dialyse contre une solution de polyvinylpyrrolidone, à cinquante pour cent. Après concentration, on ramène le volume des solutions au volume de départ et l'on obtient ainsi quatre solutions protéiques que nous désignerons par les lettres A B C et D, selon leur ordre d'élution de la colonne chromatographique.

La recherche de l'activité menée dans les conditions normalisées, en présence de la fraction F 1 du sérum, nous a montré que la réunion des quatre fractions est active. Nous avons alors étudié l'activité de chaque composant pris isolément, puis l'activité des composants associés deux par deux et trois par trois. Les résultats de ces essais sont consignés dans le tableau II. On note qu'aucune des fractions chromatographiques

Fractions	A	B	C	D	A + B	A + C	A + D	B + C	B + D	C + D
Activité	O	O	O	O	O	O	O	+	O	O

Fractions	A + B + C	A + B + D	A + C + D	B + C + D
Activité	+	O	O	+

TABLEAU 2 - *Activité des divers composants de F 2 isolés sur la suspension d'Eberthella typhosa, en présence de la fraction F 1.*
O = activité nulle
+ = activité positive.

prises isolément n'est active et ce quelle que soit la quantité de celles-ci introduite dans le système lytique. Par contre la réunion de deux d'entre elles restitue une activité. Celle-ci n'atteint cependant pas l'activité de la fraction F 2 du sérum avant chromatographie. En procédant à un titrage de l'activité, en mettant en présence d'un volume fixe de fraction F 1 des volumes variables de fraction F 2 et de mélange des composants chromatographiques B et C, on voit que le titre en obsistine avant

chromatographie est de 10 unités/ml, et que le mélange de B et C ne titre plus que 3,2 unités/ml.

Comme nous ne récupérons dans les conditions opératoires exposées, que 92,3 à 95 pour cent des protéines introduites sur la colonne, on pouvait soupçonner la rétention d'un composé actif. De même pouvait-on soulever l'hypothèse de la participation au système lytique d'un composé non protéique, par exemple d'un composé polysaccharidique jouant un rôle analogue à l'héparine dans le cas de la lipoprotéine-lipase. Nous avons entrepris une série d'expériences dans lesquelles, après passage de la solution tamponnée de chlorure de sodium 0,5 M, la colonne a été perfusée à l'aide d'une solution tampon dont la concentration en chlorure de sodium a été portée à 2 moles, perfusion suivie d'un lavage à l'alcool acidifié (alcool acidifié par de l'acide chlorhydrique jusqu'à ce que le pH apparent au papier réactif atteigne la valeur de 5,3). Après élution et parallèlement au dosage des protéines, nous avons dosé les oses dans tous les tubes du collecteur de fractions. Parmi les nombreuses méthodes de dosage des oses totaux proposées, ne nécessitant pas de défécation ni d'hydrolyse préalable des solutions, nous avons choisi la méthode à l'orcinol. Cette méthode est basée sur l'obtention d'une coloration orangée que donnent les oses à chaud en présence d'une solution d'orcinol dans l'acide sulfurique légèrement dilué. La coloration est stable pendant six heures. On mesure la densité optique à 510 mμ. La méthode permet de doser entre 100 et 400 μg de glucides. Dans chaque série il faut introduire un témoin interne contenant une quantité connue de glucose. La technique suivie est celle de Montreuil et Scheppler (75). La figure 10 reproduit les courbes d'élutions obtenues d'une part en fonction des protéines éluées et d'autre part en fonction de la quantité de glucides présents dans chaque tube d'élution.

On voit ainsi qu'aucun composé glucidique n'est élué en dehors des pics protéiques. Les deux courbes se superposent pratiquement. L'hypothèse d'un activateur polysaccharidique doit donc être écartée. Les perfusions supplémentaires auxquelles les colonnes chromatographiques ont été soumises, permettent l'élution de deux autres petites fractions protéiques, portant le pourcentage des protéines récupérées à 97,5 ou 99 pour cent selon les expériences. Nous avons vérifié que ces deux dernières fractions ne manifestent aucune activité propre et que leur addition aux fractions B et C n'entraîne aucune activation.

Les essais de chromatographie dans lesquels l'élution de la fraction F 2 du sérum a lieu à l'aide de 8 gradients de molarité en chlorure de sodium, répartis entre les concentrations 0,05 M et 0,5 M, permettent de scinder les protéines de F 2 en 8 pics bien distincts. Malheureusement, ces diverses fractions prises isolément ou en mélange paraissent dénuées d'activité.

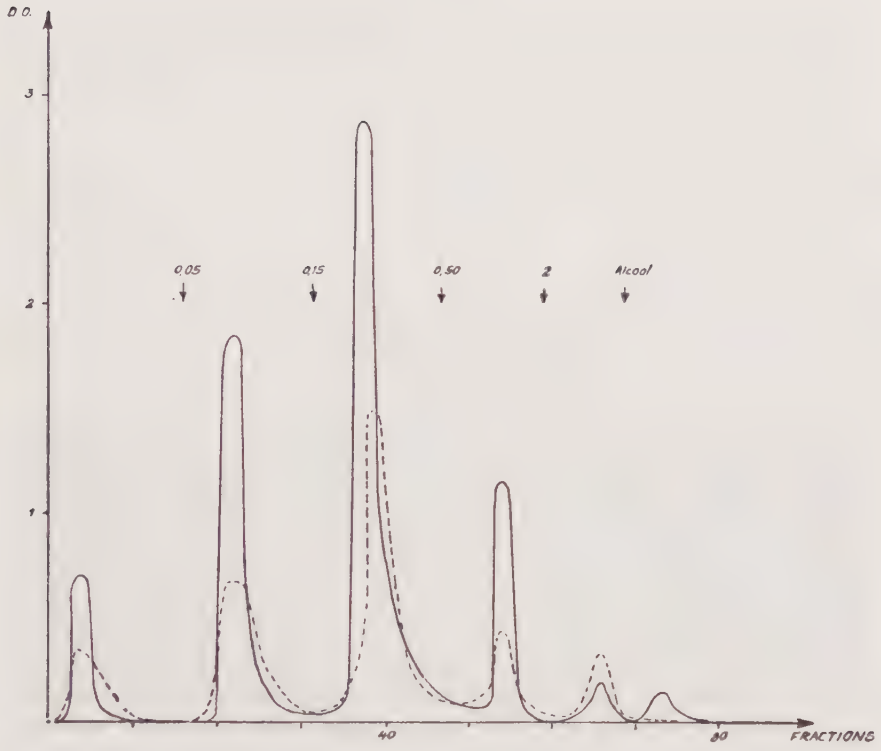

FIG. 10 - *Chromatographie de la Fraction F 2 du sérum sur DEAE.*
——— = *courbe d'élution des protéines: en abscisses les fractions éluées, en ordonnées la densité optique des fractions à* 280 mμ,
- - - - = *courbe d'élution des oses, en abscisses les fractions recueillies, en ordonnées la quantité d'oses.*

En somme, la chromatographie sur diéthylaminoéthylcellulose permet de scinder l'activité liée à la deuxième fraction sérique en deux parties, mais la perte d'activité est importante. Les tentatives d'une purification plus poussée à l'aide des mêmes techniques ont échoué. Comme nous avons éliminé la possibilité de rétention d'un composé protéique actif et la participation d'un composé glucidique, la perte d'activité enregistrée et les échecs d'un fractionnement plus grand paraissent devoir être portés au compte d'une dénaturation protéique. Mais si ces expériences ne sont pas quantitatives, elles permettent cependant d'affirmer que l'activité de la deuxième fraction du sérum n'est pas non plus, comme pour la fraction F 1, l'apanage d'une seule protéine, mais qu'elle se trouve sous l'influence d'au moins deux composants protéiques.

Chapitre XI

DISCUSSION

Il existe dans le sang normal un système capable de lyser les bactéries à Gram négatif et que Colobert et Kirn ont désigné sous le nom d'obsistine. Des études préliminaires avaient montré l'impossibilité d'identifier ce système lytique à la plupart des systèmes antibactériens décrits jusqu'ici avec quelques précisions dans la littérature. Ainsi furent soigneusement discutés les rapports qui auraient pu exister entre l'obsistine d'une part, et le complément, les anticorps, la properdine, le lysozyme d'autre part (23). Tous ces facteurs paraissent étrangers au système de l'obsistine. Il nous a paru utile de compléter ce travail en recherchant une parenté éventuelle entre la lipoprotéine-lipase du sérum et l'obsistine.

On pouvait penser, comme nous l'avons montré dans le chapitre IV, que la lipoprotéine-lipase pourrait manifester son activité enzymatique sur les parois des bactéries à Gram négatif, riches en lipides, soit en entraînant la dissolution complète de la paroi, soit en altérant l'endotoxine constituant la couche externe de la paroi et par suite découvrant la couche interne que le lysozyme peut hydroliser. Cette hypothèse de travail basée sur les acquisitions récentes dans le domaine de la constitution et de la structure de la paroi ectoplasmique des bactéries, se trouvait étayée par un ensemble de propriétés communes aux deux facteurs. Ainsi Korn et Quigley (60) ont montré le rôle inbihiteur des cations divalents sur l'activité de la lipoprotéine-lipase. Or l'obsistine est également très sensible à la présence des ions divalents. Pour qu'elle manifeste son activité, il est nécessaire d'éliminer ou de chélater les ions Ca^{++}. Les ions Mg^{++} inhibent également l'obsistine et ce, à des concentrations aussi faibles que 0,007 M (23). D'autre part Brown (14) et à sa suite Korn (57) ont étudié l'action du chlorure de sodium sur l'activité de la lipoprotéine-lipase. L'enzyme est inhibé à des concentrations 0,35 M en chlorure de sodium. Si l'on observe le comportement de l'obsistine en présence du même sel, on voit le même phénomène se produire et à

partir d'une concentration en chlorure de sodium 0,42 M, l'activité lytique est pratiquement complètement inhibée. Enfin, si l'on se rapporte aux observations de thermostabilité, on note que la lipoprotéine-lipase présente une sensibilité très prononcée à la chaleur. Elle est détruite par un chauffage de dix minutes à 50 - 60° C. L'obsistine présente également une nette thermolabilité, elle perd son activité par un chauffage de soixante minutes à 50° C, trois minutes à 56° C ou une minute à 62° C.

Toutes ces données à l'appui, il nous a paru légitime d'émettre une hypothèse sur l'identité des deux facteurs et sur un rôle éventuel de la lipoprotéine-lipase dans la bactériolyse non spécifique. Cette hypothèse ne s'est pas trouvée confirmée par les expériences que nous avons effectuées. Ainsi, le précipité isoélectrique des protéines à pH 5,5, qui selon Nikkila renferme la majorité de l'activité de la lipoprotéine-lipase, ne montre aucune activité lytique sur les bactéries. Le plasma post-héparinique d'un animal ne montre aucune augmentation d'activité lytique par rapport à celle observée avant l'injection d'héparine. L'héparine ajoutée *in vitro* ne produit aucune activation ou stabilisation du système lytique, contrairement à son action sur la lipoprotéine-lipase. Enfin, si la lipoprotéine-lipase, tout en ne s'identifiant pas totalement à l'obsistine, devait cependant jouer un rôle dans l'activité lytique des sérums normaux, l'addition de sulfate de protamine, inhibiteur spécifique de l'enzyme, devrait bloquer celui-ci et nous ne devrions plus observer de lyse bactérienne. Les expériences rapportées montrent qu'il n'en est rien. L'addition de sulfate de protamine entraîne un retard dans la lyse bactérienne, mais l'activité lytique n'est pas inhibée.

Il nous paraît donc possible de conclure qu'il n'y a aucune identité entre la lipoprotéine-lipase et le facteur lytique étudié, présent dans les sérums normaux. De même peut-on écarter toute intervention de la lipoprotéine-lipase dans le système lytique de l'obsistine.

Dans ces conditions, il nous a paru judicieux d'entreprendre la séparation et la purification des principes actifs de l'obsistine indépendamment de toute hypothèse sur leur nature. Il convenait pour cela de normaliser l'épreuve et d'opérer toujours dans les conditions strictes d'un système lytique donné. Pour les mesures quantitatives d'activité, nous avons adopté la technique décrite par Colobert, Kirn, Servant et Montagnon (25). Il existe en effet une zone de dilution du sérum telle que se manifeste une proportionnalité entre l'intensité de la lyse mesurée au bout d'un temps donné et la quantité de sérum utilisé. La pente de la droite représentative peut ainsi servir de mesure relative du titre en obsistine. Nous avons adapté cette même technique au titrage de l'activité des diverses fractions protéiques que nous avons préparé au cours de ce travail. Nous avons également pris soin d'effectuer constamment

nos essais sur un mélange de sérums d'au moins dix donneurs, choisis pour n'avoir pas été vaccinés récemment contre les salmonelloses et pour lesquels on n'avait pas la notion de salmonelloses dans leurs antécédents. Nous avons voulu par là nous mettre à l'abri des variations individuelles d'un donneur à l'autre et des interférences possibles avec d'autres systèmes bactériolytiques que celui étudié.

Les premières opérations ont consisté à fractionner le mélange des sérums par relargage par les phosphates. Elles nous ont permis d'isoler deux fractions F 1 et F 2 dépourvues d'activité lytique, mais que leur mélange restaure. L'obsistine apparaît donc à ce stade comme un système constitué d'au moins deux fractions. Chacune d'elles est hétérogène, comme le montre l'électrophorèse sur papier. Le principe actif contenu dans la première fraction se conserve longtemps sans s'altérer à la température ordinaire, mais il ne supporte pas la lyophilisation. La dialyse contre l'eau pure le dénature également. Contrairement à F 1, la fraction F 2 supporte bien la lyophilisation et la dialyse contre l'eau pure, mais très thermolabile, cette fraction s'inactive rapidement en solution maintenue à 4° C.

Les divers essais que nous avons effectués pour rechercher l'activité lytique du mélange des deux fractions nous ont permis de préciser l'importance des ions phosphates. Leur présence est nécessaire pour que l'activité lytique du mélange se manifeste et la concentration optimale se situe entre 0,05 et 0,10 M. Au-delà, les ions phosphates inhibent fortement l'activité lytique et cette inhibition est pratiquement totale pour une concentration 0,16 M. Un autre fait important est apparu dans l'étude de l'activité du mélange des deux fractions. L'activité initiale du sérum est restaurée par le mélange de F 1 et de F 2 mais avec une intensité proportionnelle à la concentration de F 2, à condition que F 1 soit présent à une concentration minima. Ce fait pose la question de savoir si les variations du titre en obsistine observées à la suite de vaccinations ou d'infections sont dues à l'augmentation ou à la diminution du principe actif des deux fractions à la fois. On peut en effet supposer que la vaccination ou l'infection n'entraîne qu'une augmentation du principe actif de la seconde fraction F 2, ce qui se traduira par une augmentation du pouvoir lytique du sérum.

Les fractions F 1 et F 2 ne sont cependant pas des protéines pures, mais représentent chacune un mélange de protéines. En tentant d'isoler de ce mélange la protéine responsable de l'activité de F 1, nous avons caractérisé par la précipitation par le sulfate d'ammonium deux sous-fractions. Chacune d'elles manifeste une activité très faible, mais cette activité se trouve considérablement renforcée par le mélange. Ces deux sous-fractions elles-mêmes représentent encore un mélange de protéines. Ainsi, la première de ces sous-fractions, homogène à l'électrophorèse sur

papier, est en réalité encore constituée par un mélange d'au moins cinq protéines, comme le montre la courbe de précipitation par le sulfate d'ammonium à concentration variable. La chromatographie sur diéthylaminoétyhlcellulose a permis d'autre part de fractionner F 2 en 4 sous-fractions. Celles-ci, prises chacune isolément en présence de F 1, n'induisent aucune activité lytique. La première et la dernière paraissent ne constituer que des impuretés, mais le mélange de la seconde et de la troisième est actif. La fraction F 2 du sérum apparaît donc constituée d'au moins deux composants apparemment protéiniques, la recherche de composés glucidiques actifs s'étant révélée négative.

Les différents essais nous ont toujours permis de retrouver qualitativement les résultats que nous avons rapportés, mais non pas quantitativement. Les variations d'activité que nous avons notées après les divers fractionnements, étaient, dans certains cas, importants. Les tentatives d'un fractionnement plus grand et de l'isolement d'une protéine homogène responsable de l'activité se sont toujours soldées par des échecs. Ces variations d'activité et ces échecs paraissent devoir être portés au compte d'une dénaturation protéique. Nous avons souligné la perte rapide de l'activité de la fraction F 2 du sérum par simple séjour à 4° C. Bien que toutes les opérations aient été menées en chambre froide à 4° C, la réalisation de la chromatographie, de la dialyse et de la concentration des solutions nécessite un temps plus ou moins long, capable d'expliquer les variations d'activité enregistrées.

Notre travail nous a ainsi permis de démontrer que l'activité lytique des sérums normaux, « l'obsistine », n'est pas l'apanage d'une ou de deux protéines, mais qu'elle est liée à la synergie d'au moins quatre facteurs de nature protéique, individuellement inactifs. Il apparaît donc que nous nous trouvons en présence d'une activité biologique due à un système complexe, comme il est fréquent dans le sang. Si l'obsistine ne s'identifie à aucun des facteurs bactériolytiques décrits avec quelques précisions jusqu'à ce jour dans la littérature, il n'est cependant pas exclu que l'un de ces facteurs ou que l'un des composants de ces systèmes puisse s'identifier avec l'une ou l'autre des quatre fractions que nous avons mises en évidence dans notre travail.

RÉSUMÉ

Le facteur lytique présent dans le sérum humain normal, actif sur diverses espèces bactériennes à Gram négatif et désigné sous le nom d'obsistine, a été comparé à la lipoprotéine-lipase. L'hypothèse d'une identité des deux facteurs, basée sur les connaissances actuelles de la structure et de la composition de la paroi des bactéries et étayée par un ensemble de propriétés communes, ne saurait être retenue. Les expériences rapportées montrent que l'obsistine est indépendante de la lipoprotéine-lipase.

Le sérum sanguin peut être fractionné par relargage par les phosphates, en deux parties, en portant la concentration molaire en phosphates à 1,5 M, puis en élevant cette concentration à la valeur 2,5 M. Ces fractions, désignées par les symboles F 1 et F 2, sont isolément inactives, mais leur réunion restaure l'activité primitive du sérum. Il existe une proportion relative optimale entre ces deux fractions, assurant une lyse maximale de la suspension bactérienne de référence. Les caractères de stabilité de chacune de ces fractions ont été précisés, ainsi que les conditions d'activité de leur mélange en présence d'ions phosphates.

Le fractionnement de F 1 par les phosphates ou par le sulfate d'ammonium a permis d'individualiser deux facteurs, individuellement incapables, en présence de F 2, de provoquer une lyse, mais leur mélange restitue en grande partie l'activité lytique.

La chromatographie de F 2 sur colonne de diéthylaminoétyhlcellulose a permis d'isoler quatre fractions. Deux d'entre elles paraissent représenter des impuretés. Les deux autres, individuellement inactives en présence de F 1, manifestent en mélange une forte activité lytique.

L'activité lytique de l'obsistine apparaît comme une activité biologique complexe, liée à la synergie d'au moins quatre facteurs, de nature protéinique et individuellement inactifs.

BIBLIOGRAPHIE

1. Amano (T.), Inai (S.), Seki (Y), Kashiba (S), Fujikawa (K.) et Nishimura (S.). — Med. J. Osaka Univ., 1954, *4*, 401.
2. Anderson (T. F.). — J. Cellular Comp. Physiol., 1945, *25*, 1.
3. Anderson (N. G.) et Fawcett (B.). — Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 1950, *74*, 768.
4. Anfinsen (C. B.), Boyle (E.) et Brown (R. K.). — Science, 1952, *115*, 583.
5. Babudieri (B.) et Bietti (G. B.). — Arch. Ophtalmol. (Chicago), 1945, *33*, 449.
6. Behring et Nissen. — Cité par Bordet dans « Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses » (11).
7. Bier (O. G.), Leyton (G.), Mayer (M. M.) et Heidelberger (M.). — J. Exptl. Med., 1945, *81*, 449.
8. Boasson (E. H.).— J. Immunol., 1938, *34*, 281.
9. Boivin (A.), Mesrobeanu (I.) et Mesrobeanu (L.). — C. R. Soc. Biol. 1933, *113*, 490.
10. Bordet (J.). — Ann. Inst. Pasteur, 1898, *12*, 688.
11. Bordet (J.). — Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses, 2e édit., Masson édit., Paris, 1939.
12. Brand (E.). — Berlin. Klin. Woch., 1907, *46*, 1075.
13. Briggs. — J. Biol. Chem., 1924, *59*, 255.
14. Brown (R. K.), Boyle (E.) et Anfinsen (C. B.). — J. Biol. Chem., 1953, *204*, 423.
15. Buchner (H.). — Centr. Bakteriol. Parasit., 1889, *6*, 561.
16. Buchner (H.). — Centr. Bakteriol. Parasit., 1891, *10*, 699.
17. Colobert (L.). — Bull. Soc. Chim. Biol., 1957, *39*, 135.
18. Colobert (L.). — Ann. Inst. Pasteur, 1958, *95*, 156.
19. Colobert (L.). — Path. et Biol., 1960, *8*, 1023.
20. Colobert (L.) et Creach (O.). — Biochem. Biophys. Acta, 1960, *40*, 167.
21. Colobert (L.) et Creach (O.). — Path. et Biol., 1961, *9*, 361.
22. Colobert (L.) et Dirheimer (G.). — C. R. Acad. Sc., 1960, *250*, 423.
23. Colobert (L.) et Kirn (A.). — Ann. Inst. Pasteur, 1960, *99*, 69.
24. Colobert (L.), Kirn (A.), Montagnon (B.) et Servant (P.). — Ann. Inst. Pasteur, 1961, *100*, 613.
25. Colobert (L.), Kirn (A.), Servant (P.) et Montagnon (B.). — Ann. Inst. Pasteur, 1961, *100*, 600.
26. Colobert (L.) et Lenoir (J.). — Ann. Inst. Pasteur, 1957, *92*, 74 et 88.
27. Creach (O.). — Thèse Pharm. Univ. LYON, 1960, n° 479.
28. Delaunay (A.). — Rev. Path. Gen. Physiol. Clin., 1958, *697*, 457.

29. Delaunay (A.), Henon (M.), Bazin (S.) et Pelletin (M.). — Presse Med., 1956, *64*, 65.

30. Derrien (Y.). — Bull. Soc. Chimie Biol., 1944, *26*, 1091.

31. Derrien (Y.), Steyn-Parve (E. P.) et Cotte (M.). — Bull. Soc. Chimie Biol., 1951, *33*, 213.

32. Derrien (Y.), Steyn-Parve (E. P.), Cotte (M.) et Laurent (G.). — Bioch. Biophys. Acta, 1952, *9*, 49.

33. Dunlop (E. M.). — J. Pathol. Bact., 1928, *31*, 769.

34. Ehrlich (P.). — In Studies on Immunity, 1906, John Wilen and Sons édit., New-York.

35. Engelberg (H.). — Amer. J. Physiol., 1955, *181*, 309.

36. Engelberg (H.). — J. Biol. Chem., 1956, *222*, 601.

37. Ferrata (A.). —Berlin. Klin. Woch., 1907, *44*, 366.

38. Fleming (A.). — Proc. Roy. Soc. London, 1922, *93*, 306.

39. Gaines (S.) et Landy (M.). — J. Bacteriol., 1955, *69*, 628.

40. Gates (H. S.) et Gordon (R. S.). — Federat. Proceed., 1958, *17*, 437.

41. Gordon (R. S.). — J. Clin. Invest., 1955, *34*, 477.

42. Gordon (J.) et Carter (H. S.). — J. Path. Bact., 1932, *35*, 549.

43. Gordon (J.), Whitehead (H. R.) et Wormall (A.). — Biochem. J., 1926, *20*, 1028.

44. Gordon (J.) et Wormall (A.). — J. Path. Bact., 1928, *31*, 753.

45. Gornall, Bardawill et David. — J. Biol. Chem., 1949, *177*, 751.

46. Gronroos (P.). — Amer. Med. exptl. et Biol., 1955, *33*, 310.

47. Grula (E. A.) et Hartsell (S. E.). — Bact. Proceed., 1955, *33*, 102.

48. Hahn (P. F.). — Science, 1943, *98*, 19.

49. Hartsell (S. E.). — 1° Symp. Int. s. Lysozima d. Fleming, 1959, Museo della Scienza e della Tecnica, Milano.

50. Hurni (H).. — 6e Congrès Europ. d'Hématol., Copenhague, 1957.

51. Isaeff. — Z. Hyg. Infektionskr, 1884, *16*, 287.

52. Kabat (E. A.) et Mayer (M. M.). — Experimental Immunochemistry, Thomas, edit. Springfield (U.S.A.), 1948.

53. Kern (R. A.), Kingkade (M. J.), Kern (S. F.) et Behrens (O. K.). — J. Bacteriol., 1951, *61*, 171.

54. Klein (E.). — Brit. Med. J., 1893, *1*, 632.

55. Kolle (W.) et Hetsch (H.). — In La bactériologie expérimentale appliquée à l'étude des maladies infectieuses, 3e édit. franç., Doin édit., Paris, 1918.

56. Korn (E. D.). — Science, 1954, *120*, 399.

57. Korn (E. D.). — J. Biol. Chem., 1955, *215*, 1.

58. Korn (E. D.). — J. Biol. Chem., 1955, *215*, 15.

59. Korn (E. D.). — J. Biol. Chem., 1957, *226*, 827.

60. Korn (E.D.) et Quigley (T. W.). — Biochem. Biophys. Acta, 1955, *18*, 143.

61. Landsteiner (K.). — In The specificity of serological reaction, 1945, Harward Univ. Press, Cambridge, Massach.

62. Landy (M.) et Pillemer (L.). — J. Exptl. Med., 1956, *103*, 823.

63. Landy (M.) et Pillemer (L.). — J. Exptl. Med., 1956, *104*, 383.

64. Laporte (R.), Hardre de Looze (L.) et Sillard (R.). — Ann. Inst. Pasteur, 1955, *89*, 16 et 1957, *92*, 15.

65. Laporte (R.), Hardre de Looze (L.) et Sillard (R.). — C. R. Acad. Sci., 1956, *242*, 576.

66. Levine (J.) et Mayer (M. M.). — J. Immunol., 1954, *72*, 511.

67. Levine (J.) et Mayer (M. M.). — J. Immunol., 1954, *73*, 426 et 435.

68. Linder (E.). — Diss. Univ. Berne, 1956.

69. Maaløe (O.). — On the relation between alexin and opsonin, 1946, Munsksgaard, Copenhague.

70. Mackie (J. T.) et Finkelstein (M. H.). — J. Hyg., 1931, *31*, 35.

71. Mackie (J. T.) et Finkelstein (M. H.). — J. Hyg., 1932, *32*, 1.

72. Mayer (M. M.) et Levine (L.). — J. Immunol., 1954, *72*, 511 et 516.

73. Mayer (M. M.), Levine (L.), Rapp (H. J.) et Marucci (A. A.). — J. Immunol., 1954, *73*, 443.

74. Meyer (K.), Thompson (R.), Palmer (J. W.) et Khorazo (D.). — Science, 1934, *79*, 61.

75. Montreuil (J.) et Scheppler (M.). — Bull. Soc. Chim. Biol., 1959, *41*, 13.

76. Morgan (W. T. J.). — Biochem. J., 1937, *31*, 2003.

77. Muir (R.). — In Studies on Immunity, 1909, Oxford Univ. Press, London.

78. Muschel (L. H.), Carey (W. F.) et Baron (L. S.). — 1° Sympt. Inter. s. Lysozyma d. Fleming, 1959, Museo della Scienza e della Tecnica, Milano.

79. Nikkila (E. A.). — Scandin. J. Clin. and Labo. Invest., 1953, *5*, supplem. 8.

80. Nuttal (G.). — Z. Hyg. Infektionskr., 1888, *4*, 353.

81. Osawa (E.) et Muschel (L. H.). — J. Immunol., 1960, *84*, 203.

82. Palmer (J. W.) et Gerlough (T. D.). — Science, 1940, *92*, 155.

83. Pettersson (A.). — Z. Immunitätsf., 1936, *88*, 210.

84. Pfeiffer (R.) et Isaeff. — Z. Hyg. Infektionskr., 1894, *17*, 355.

85. Pillemer (L.), Blum (L.), Lepow (I. H.), Ross (O. A.), Tood (E. W.) et Wardlaw (A. C). — Science, 1954, *120*, 279.

86. Pillemer (L.), Ecker (E. E.), Oncley (J. L.) et Cohn (E. J.). —J. Exptl. Med., 1941, *74*, 297.

87. Pillemer (L.), Seifter (S.), San Clemente (C. L.) et Ecker (E. E.). — J. Immunol., 1943, *47*, 205.

88. Raistrick (H.) et Topley (W. C. C.). — J. Exptl. Med., 1934, *15*, 113.

89. Repaske (R.). — Biochem. Biophys. Acta, 1956, *22*, 189.

90. Repaske (R.). — Biochem. Biophys. Acta, 1958, *30*, 225.

91. Riegler (E.). — Z. Anal. Chem., 1914, *53*, 242.

92. Ritz (H.). — Z. Immunitätsf., 1912, *12*, 644.

93. Robinson (D. S.). — Quart. J. Exptl. Physiol., 1956, *41*, 195.

94. Robinson (D. S.) et French (J. E.). — Quart. J. Exptl. Physiol., 1953, *38*, 233.

95. Robinson (D. S.) et French (J. E.). — Quart. J. Exptl. Physiol., 1957, *42*, 151.

96. Ross (O. A.), Moritz (A. H.), Walker (O. J.), Wurz (L.), Tood (K. W.) et Pillemer (L.). — Fed. Proceed., 1955, *14*, 418.

97. Rowley (D.). — Lancet, 1955, *268*, 232.

98. Salton (M. R. J.). — Nature, 1952, *170*, 746.

99. Salton (M. R. J.). — Biochem. Biophys. Acta, 1953, *10*, 512.

100. Salton (M. R. J.). — In Bacterial Anatomy, 6° Symp. of Soc. f. Gen. Microbiol., 1956, Cambridge Univ. Press, London.

101. Scaffidi (V.), Cerbone (R.) et Petrelli (C.). — Riv. Pat. Sper., 1932, *8*, 6.

102. Schwartz (L.), Dunsmore (R. A.) et Goldmann (A.). — Science, 1953, *117*, 482.

103. Scott (T. A.) et Melvin (E. H.). — Anal. Chem., 1953, *28*, 1656.

104. Seifter (S.), Dozois (T. F.) et Ecker (E. E.). — J. Immunol., 1944, *49*, 45.

105. Shore (B.), Nichols (A. V.) et Freemann (N. K.). — Proceed. Soc. Exptl. Biol. Med., 1953, *83*, 216.

106. Thompson (R.). — Arch. Path., 1940, *30*, 1096.

107. Vendrely (R.), Palmade (C.) et Vendrely (C.). — Nature, 1956, *178*, 1044.

108. Wardlaw (A. C.) et Pillemer (L.). — J. Exptl. Med., 1956, *103*, 553.

109. Warren (G. H.), Gray (J.) et Bartell (P.). — J. Bacteriol., 1955, *70*, 614.

110. Warren (G. H.), Gray (J.) et Yurchenco (J. A.). — J. Bacteriol., 1957, *74*, 788.

111. Wedgwood (R. J.), Ginsberg (H. S.) et Pillemer (L.). — J. Exptl. Med., 1956, *104*, 707.

112. Westphal (O.), Luderitz (O.) et Bister (F.). — Z. Naturforsch., 1952, *7 b*, 148.

113. Zuckermann (L.) et Singher (H. O.). — Proceed. Soc. Exptl. Biol. Med., 1955, *89*, 315.

Vu, Strasbourg, le 12 Septembre 1963

Le Président du Jury:

R. SARTORY

Vu et approuvé:

Strasbourg, le 23 Septembre 1963

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
Pour le Doyen,
L'Assesseur:

J. SCHREIBER

Vu et permis d'imprimer:

Strasbourg, le 27 Septembre 1963

Le Recteur de l'Académie
Président du Conseil de l'Université:
Pour le Recteur,
Le Vice-Président du Conseil de l'Université:

F. WENDEL

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 11

Première Partie: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

— *Chapitre I:* Le système anticorps complément 17
— *Chapitre II:* La properdine 26
— *Chapitre III:* Le lysozyme 30
— *Chapitre IV:* La lipoprotéine-lipase 36
— *Chapitre V:* L'obsistine 38

Deuxième Partie: RECHERCHES PERSONNELLES

— *Chapitre VI:* Titrage de l'activité lytique 45
— *Chapitre VII:* Essai d'identification de l'obsistine à la lipoprotéine-lipase 49
— *Chapitre VIII:* Fractionnement du sérum 54
— *Chapitre IX:* Purification de la première fraction du sérum 63
— *Chapitre X:* Purification de la seconde fraction du sérum 69
— *Chapitre XI:* Discussion 76

RÉSUMÉ 81

BIBLIOGRAPHIE 83

IMPRIMERIE ALSATIA - 10, rue Bartholdi

Dépôt légal 4e trim. 63 - Imprimerie N° 1019